



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE
CATECOLASE DE UM COMPLEXO MONONUCLEAR DE
COBRE COM UM LIGANTE NÃO-SIMÉTRICO**

SARITA WISBECK

Florianópolis
Novembro/2015

Sarita Wisbeck

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE CATECOLASE DE
UM COMPLEXO MONONUCLEAR DE COBRE COM UM LIGANTE
NÃO-SIMÉTRICO**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Adailton João Bortoluzzi

Florianópolis
11/2015

Sarita Wisbeck

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE DE CATECOLASE DE
UM COMPLEXO MONONUCLEAR DE COBRE COM UM LIGANTE
NÃO-SIMÉTRICO**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi
Orientador

Prof. Dr. Ademir Neves

Prof.^a Dr.^a Rosely A. Peralta

Florianópolis
Novembro/2015

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus por guiar meu caminho até aqui, e aos meus pais Maria e Jairo pelo esforço para tornar este sonho realidade. As minhas lindas irmãs Sabrina e Samara, eu quero agradecer pelas conversas, pelo apoio e pela força que vocês me deram a vida inteira, também por me darem as jóias mais preciosas que guardo em meu coração, meus sobrinhos Guilherme e Kainoa. A minha família citada eu quero dizer que tudo isso é para vocês e por vocês, e que não há como agradecer a presença de vocês em minha vida.

Ao meu namorado Lucas, quero agradecer por todo carinho, companhia, compreensão e paciência nos momentos mais difíceis. Obrigada por fazer parte da minha vida na química e fora dela. Quero agradecer também a sua família, que hoje é minha também.

Aos amigos, quero agradecer a todos que tornaram esse curso mais leve, pelos momentos de descontração dentro das aulas e também fora delas. Citar nomes ficaria complicado, mas há duas pessoas em especial que eu quero agradecer por todas as risadas e momentos de felicidade, Amanda e Maria Paula, espero ter vocês pra sempre ao meu lado.

Quero agradecer também aqueles que fizeram este trabalho se tornar realidade, em primeiro lugar ao professor Adailton pela orientação, oportunidade e paciência em todos os momentos. Também a todos os meus colegas do LABINC pelo convívio no dia-a-dia, e pelos conselhos que fizeram crescer este trabalho. Quero agradecer em especial a Graciela por me “adotar” e ser essa amiga incrível que faz tudo o que pode para ajudar, este trabalho não seria possível sem você. Também agradeço a Cacau, André, Marcos, Rhannanda e Bruna pela ajuda, orientação e pela companhia de vocês no laboratório.

Ao CNPq e demais órgãos de fomento, agradeço por viabilizarem a execução deste projeto.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1	Bioinorgânica.....	13
2.2	Metaloenzimas.....	14
2.3	Oxirredutases – Catecol Oxidase.....	14
2.4	Ligantes para modelagem biomimética.....	17
2.5	Propriedades dos compostos de coordenação com atividade de catecolase.....	18
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo Geral.....	21
3.2	Objetivos Específicos.....	21
4.	METODOLOGIA.....	22
4.1	Materiais e Reagentes.....	22
4.2	Sínteses.....	23
4.2.1	Síntese do N,N'-bis(2-metilpiridil)-propano-1,3-diamina	23
4.2.2	Síntese do 2-piridil-1,3-bis(2-piridilmetil)hexahidropiridina	24
4.2.3	Síntese do N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-propano-1,3-diamina.....	24
4.2.4	Síntese do ligante N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)-propano-1,3-diamina.....	26
4.2.5	Síntese do complexo Perclorato de {N,N,N'- tris(2-metilpiridil)-N'(2-fenol-5-metilbenzaldeído) propano-1,3-diamina}cobre(II).....	27
4.3	Métodos de Caracterização.....	27
4.3.1	Ponto de Fusão.....	27
4.3.2	Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	28
4.3.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ¹ H e Carbono ¹³ C.....	28
4.3.4	Espectroscopia Eletrônica (UV-vis).....	28
4.3.5	Espectrometria de Massas.....	28
4.3.6	Medida Eletroquímica.....	29
4.3.7	Titulação Espectrofotométrica.....	29
4.3.8	Condutimetria.....	29
4.3.9	Cinética de Oxidação.....	30
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31

5.1	Caracterização do ligante N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)-propano-1,3-diamina.....	31
5.1.1	Espectroscopia no Infravermelho – IV.....	30
5.1.2	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ¹ H.....	33
5.1.3	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – RMN ¹³ C.....	34
5.1.4	Espectrometria de Massas – ESI-MS.....	36
5.2	Caracterização do complexo Perclorato de {N,N,N'- tris(2-metilpiridil)-N'(2-fenol-5-metilbenzaldeído) propano-1,3-diamina}cobre(II).....	37
5.2.1	Espectroscopia no Infravermelho – IV.....	37
5.2.2	Espectroscopia Eletrônica na região do UV-vis.....	38
5.2.3	Condutimetria.....	43
5.2.4	Espectrometria de Massas – ESI-MS.....	44
5.2.5	Medida Eletroquímica.....	44
5.2.6	Titulação Espectrofotométrica.....	46
5.2.7	Cinética de oxidação do 3,5-DTBC.....	47
6.	CONCLUSÕES.....	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Centro binuclear de cobre da catecol oxidase no estado oxidado.....	14
FIGURA 2 Estrutura tridimensional da catecol oxidase.....	16
FIGURA 3 Possíveis modos de ligação do centro de cobre no substrato.....	18
FIGURA 4 Espectro de IV do ligante H_1L_1	31
FIGURA 5 Espectro de RMN 1H do ligante H_1L_1	33
FIGURA 6 Espectro de RMN ^{13}C do ligante H_1L_1	34
FIGURA 7 Espectro de massa experimental do H_1L_1 em MeOH.....	35
FIGURA 8 Distribuição isotópica e espectro experimental do ligante H_1L_1	36
FIGURA 9 Espectro de IV do ligante sobreposto ao do complexo.....	37
FIGURA 10 Espectro UV-vis do ligante e complexo em CH_3CN	40
FIGURA 11 Espectro UV-vis do complexo em diferentes concentrações.....	41
FIGURA 12 Desdobramento dos orbitais em função do campo ligante.....	41
FIGURA 13 Espectro de reflectância difusa para o complexo em KBr.....	42
FIGURA 14 Espectro de massa experimental do $[Cu(H_1L_1)]$ em CH_3CN	43
FIGURA 15 Distribuição isotópica e espectro experimental do $[Cu(H_1L_1)]$	44
FIGURA 16 Voltamograma Cíclico para o complexo em H_2O	45
FIGURA 17 Espectro de UV-vis do complexo com variação de pH.....	46
FIGURA 18 Dependência da velocidade da oxidação do 3,5-DTBC com o pH.....	48
FIGURA 19 Dependência da velocidade com a concentração de 3,5-DTBC.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Principais papéis biológicos de alguns elementos inorgânicos.....	12
TABELA 2 Materiais, reagentes, e solventes utilizados.....	21
TABELA 3 Atribuições das bandas no IV para o ligante e complexo.....	37
TABELA 4 Condutividade molar do complexo em diferentes solventes.....	42
TABELA 5 Comparação dos parâmetros cinéticos.....	50

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 Reação de oxidação catalisada pela catecol oxidase.....	14
ESQUEMA 2 Mecanismo proposto por Solomon para a oxidação do catecol.....	15

ESQUEMA 3 Rota sintética do CMFF.....	22
ESQUEMA 4 Rota sintética do 2pyprop.....	22
ESQUEMA 5 Rota sintética do 3py-F.....	23
ESQUEMA 6 Rota sintética do 3py-A.....	24
ESQUEMA 7 Rota sintética do ligante H_1L_1	25
ESQUEMA 8 Rota sintética do complexo $[Cu(H_1L_1)](ClO_4)_2$	26
ESQUEMA 9 Equilíbrio de espécies em solução.....	43
ESQUEMA 10 Reação de oxidação do 3,5-DTBC na presença de O_2	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ε	Coeficiente de absorvidade molar
ν	Estiramento (IV)
[]	Concentração mol L ⁻¹
δ	Deformação angular (IV)
δ_H	Deslocamento químico do hidrogênio (RMN ¹ H)
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda, no máximo de absorção
Λ_M	Condutância molar
2pyprop	N,N'-bis(2-metilpiridil)-propano-1,3-diamina
3py-A	N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-propano-1,3-diamina
3py-F	2-piridil-1,3-bis(2-piridilmetil)hexahidropiridina
3,5-DTBC	3,5-di- <i>terc</i> -butilcatecol
3,5-DTBQ	3,5-di- <i>terc</i> -butilquinona
ENH	Eletrodo normal de hidrogênio
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização via eletrospray
EtOH	Etanol
Et ₃ N	Trietilamina
His	Histidina
H ₁ L ₁	N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)- propano-1,3-diamina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IV	Infravermelho
k_{cat}	Constante catalítica
k_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{obs}	Constante observada
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-[N-morfolino]etanossulfônico
m/z	Razão massa/carga
Pd/C	Liga em pó de paládio sob carbono
P.F.	Ponto de fusão
pH	Potencial hidrogeniônico
pK _a	Potencial da constante ácida

ppm	Partes por milhão
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono
$\text{S}_{\text{N}}2$	Substituição nucleofílica bimolecular
TFA	Ácido trifluoroacético
TCLM	Transferência de carga ligante-metal
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
V_0	Velocidade inicial
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

RESUMO

Grande parte das reações biológicas catalisadas por enzimas ainda não possui mecanismo completamente conhecido. Conhecer como estas reações se processam contribui para um melhor entendimento de como doenças e desordens metabólicas ocorrem, o que pode auxiliar em seus diagnósticos e tratamentos. Uma maneira de estudar reações biológicas é a síntese de compostos modelo estruturais e/ou funcionais aos sítios ativos destas enzimas. O cobre, metal em estudo neste trabalho pertence ao sítio ativo de diversas enzimas, dentre elas a catecol oxidase. Neste projeto, foi sintetizado o N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)-propano-1,3-diamina (H_1L_1), um ligante não-simétrico, multidentado, planejado sobre o esqueleto da 1,3-propanodiamina. Este ligante foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, espectrometria de massas, e apresentou grau de pureza adequado para síntese do complexo. A partir do ligante H_1L_1 foi preparado um complexo de cobre(II), para o qual as análises indicam ser um complexo mononuclear com o ânion perclorato como contra-íon. O complexo foi analisado por espectroscopia no infravermelho, espectrometria de massas, condutimetria, espectroscopia eletrônica UV-vis e reflectância difusa, eletroquímica e titulação espectrofotométrica. Testes cinéticos de oxidação do 3,5-di-*terc*-butilcatecol foram realizados analisando efeitos de pH e concentração de substrato, e revelaram que o complexo sintetizado pode ser considerado um modelo funcional para a enzima catecol oxidase na oxidação do substrato modelo.

Palavras-chave: Complexo de cobre(II). Catecol Oxidase. Atividade catalítica. Oxidação do 3,5-DTBC.

1. INTRODUÇÃO

A química dos processos vivos é majoritariamente associada à química orgânica, porém íons inorgânicos possuem funções essenciais na manutenção e funcionamento dos sistemas biológicos. Há muito tempo a importância dos metais alcalinos e alcalinos terrosos já é conhecida em processos de transporte de carga e balanço osmótico, entretanto, outros metais encontrados em pequenas quantidades no organismo foram reconhecidos mais recentemente como essenciais à vida. A natureza utiliza das propriedades dos íons metálicos como constituintes de proteínas para realizar uma variedade de funções específicas nos processos biológicos. Com o interesse pelo estudo dos íons metálicos relacionados aos sistemas vivos surgiu a química bioinorgânica, que atua na interface entre os conhecimentos de química inorgânica e biologia.

Uma vertente da química bioinorgânica é o estudo de catálise enzimática através da síntese de compostos de coordenação modelos estruturais e/ou funcionais ao sítio ativo de enzimas. Sabe-se da importância dos íons metálicos nesses sistemas, porém esclarecer o modo de ação destas enzimas possibilita diagnosticar e tratar disfunções biológicas mais facilmente.

As enzimas que possuem íons metálicos em seus sítios ativos são chamadas de metaloenzimas, e são classificadas de acordo com a atividade desempenhada. As oxirredutases são metaloenzimas que atuam em processos de transferência de elétrons, e tem como característica metais que possuem um par redox de fácil conversão, tal como o cobre. As enzimas de cobre são classificadas em tipos I, II, III e IV em razão da distinção de seus centros ativos. No grupo das enzimas de cobre do tipo III está a catecol oxidase, uma metaloenzima que catalisa reações de oxidação de *o*-difenois levando às suas respectivas *o*-quinonas em um processo conhecido como atividade de catecolase. As quinonas resultantes são altamente reativas e sofrem reações importantes na natureza, como por exemplo, a formação de melanina.

Há um interesse contínuo na investigação de complexos de cobre com atividade de catecolase, pois estes podem servir como modelos funcionais para a catecol oxidase e também como novos catalisadores biomiméticos para outras reações de oxidação, além de contribuir para estudos mecanísticos de reações biológicas catalisadas por esta enzima.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Bioinorgânica

Para que se transforme conhecimento em avanços tecnológicos e científicos é necessário que diversas áreas da ciência caminhem juntas, e que o conhecimento seja interdisciplinar. Neste contexto pode-se considerar a química bioinorgânica uma ciência interdisciplinar, que estabelece conexões com conhecimentos em química, bioquímica, genética, medicina, microbiologia, e inclui a aplicação de técnicas físicas avançadas. Por definição, a química bioinorgânica estuda o papel dos metais no sistema biológico, tanto os metais que ocorrem naturalmente nos sistemas vivos, quanto aqueles introduzidos na forma de fármacos para diagnóstico e tratamento de doenças.¹

A descoberta de que diversos sistemas biológicos têm sua função diretamente correlacionada à presença de um íon metálico despertou interesse, e o número de pesquisas bioinorgânicas tem crescido exponencialmente, onde os estudos buscam compreender completamente a função dos metais no sistema biológico.¹ Alguns dos elementos de maior interesse bioinorgânico estão listados na Tabela 1, juntamente com suas funções biológicas principais.¹

Tabela 1 – Principais papéis biológicos de alguns elementos inorgânicos.¹

Metal	Função
Zinco	Hidrolases
Vanádio	Fixação de nitrogênio; oxidases
Manganês	Fotossíntese; oxidases
Ferro	Oxidases; transporte e armazenamento de oxigênio; transferência de elétrons
Níquel	Hidrogenases; hidrolases
Cobre	Oxidases; transporte de oxigênio; transferência de elétrons

Diversas reações biológicas ocorrem via catálise enzimática, onde íons metálicos desempenham atividades fundamentais para que a catálise ocorra. Na bioinorgânica, realizar a síntese de modelos de baixa massa molecular análogos aos

sítios ativos de enzimas viabiliza estudar de forma mais adequada sistemas biológicos de alta complexidade.²

2.2 Metaloenzimas

Faz parte da evolução humana a busca por melhor qualidade de vida e conforto no ambiente onde se vive. A descoberta de que reações catalisadas são muito mais rápidas que aquelas não catalisadas despertou interesse de pesquisadores para este campo de estudo, especialmente pela existência de catalisadores naturais presentes nos organismos vivos, as enzimas.³

As enzimas são biomoléculas complexas e de alta massa molecular, elas estão presentes nos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma extraordinária eficiência catalítica.⁴ As enzimas são formadas por sequências de aminoácidos que se organizam formando um ambiente químico favorável às reações de catálise. Estas reações ocorrem em um lugar específico chamado de sítio ativo.⁵

As metaloenzimas são enzimas que possuem um ou mais íons metálicos em sua estrutura. Este íon não participa de sua estrutura apenas durante a ligação com o substrato, mas é parte permanente dela, estando presente no seu sítio ativo ou perto dele, e exercendo total influência sobre a atividade enzimática.⁶ As metaloenzimas são classificadas de acordo com a atividade desempenhada em oxirredutases, transferases, liases, ligases, isomerases e hidrolases.⁵

2.3 Oxirredutases – Catecol Oxidase

As enzimas oxirredutases catalisam reações de oxi-redução de suma importância para os sistemas vivos, como por exemplo, a promoção da fotossíntese.⁵ Devido a conversão do par redox $\text{Cu(I)}/\text{Cu(II)}$ o íon cobre está presente em diversos processos de oxidação biológicos.⁷

As enzimas de cobre possuem uma variedade de funções biológicas envolvendo transferência de elétrons, haja vista sua importância são classificadas em tipos I, II, III e IV, em razão das distinções entre os centros metálicos.⁸ As proteínas ou enzimas de cobre do tipo I, também chamadas de proteínas azuis de cobre, possuem centros mononucleares de cobre(II) e geometria tetraédrica distorcida; sua função catalítica é promover a transferência de elétrons. As proteínas de cobre do tipo II, apresentam centros mononucleares de cobre(II) e são

caracterizadas por uma esfera de coordenação quadrado planar, são também conhecidas como proteínas normais de cobre. As proteínas ou enzimas do tipo III são representadas majoritariamente por três enzimas: hemocianina, tirosinase e catecol oxidase (Figura 1).⁹ Estas contêm em seus sítios ativos centros binucleares de cobre cercados de resíduos de histidinas com três átomos de nitrogênio doadores. Uma característica das proteínas com este sítio ativo é a sua habilidade de ligar-se reversivelmente à molécula de oxigênio em condições ambientes. Há ainda centros trinucleares de cobre, encontrados em enzimas como a ascorbato oxidase, e classificados como proteínas do tipo IV.⁸

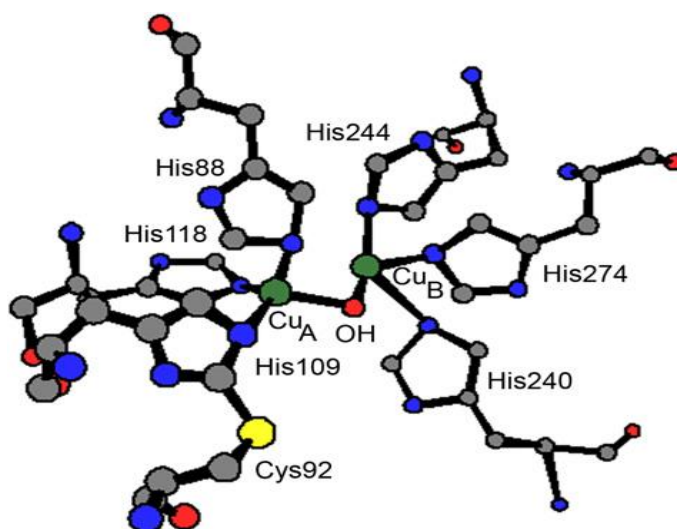
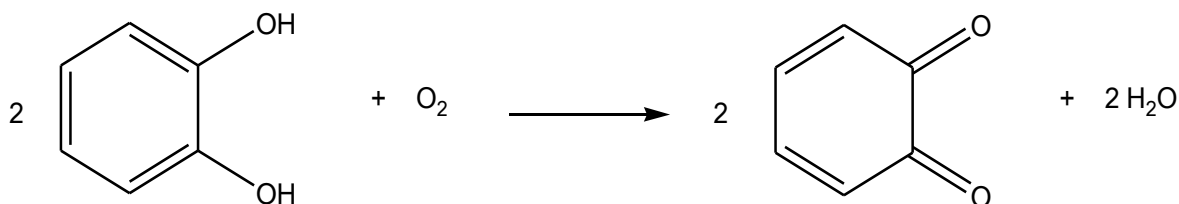


Figura 1 – Esfera de coordenação do centro binuclear de cobre da catecol oxidase no estado oxidado.⁹

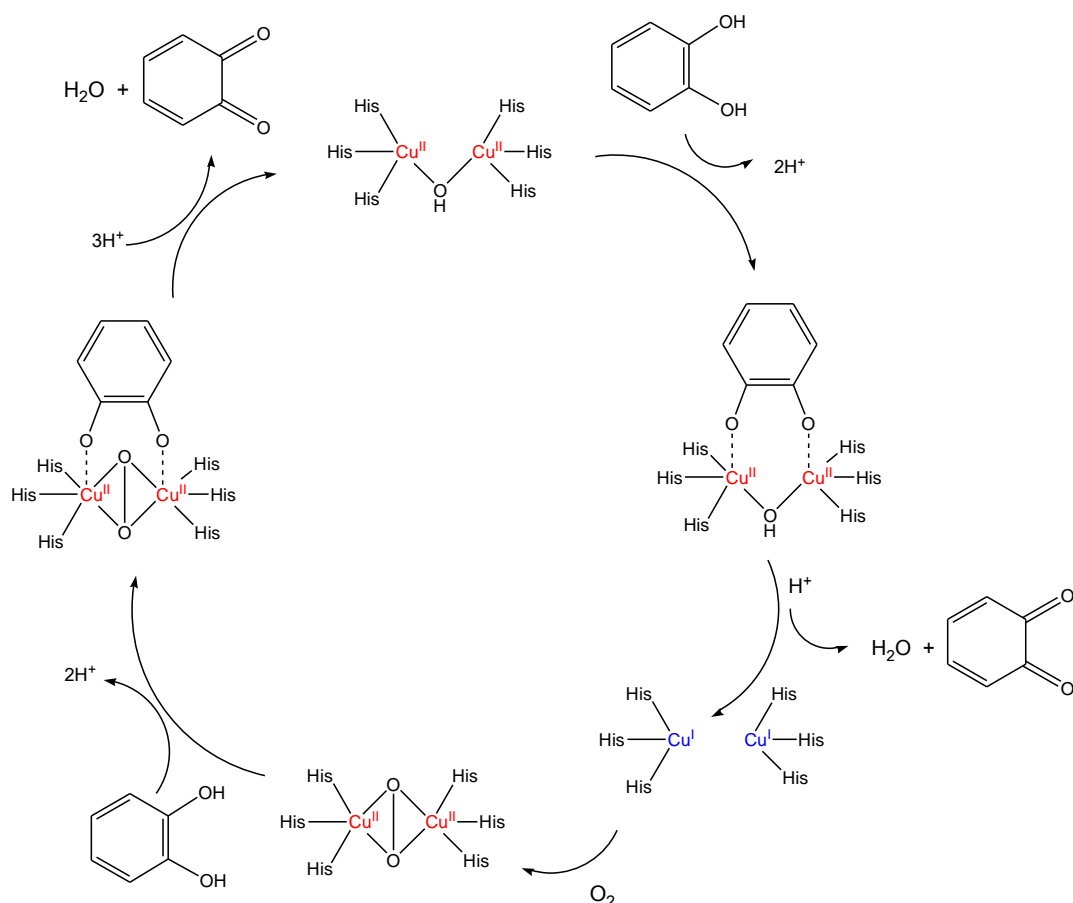
Também chamada de *o*-difenol oxidase, a primeira catecol oxidase foi isolada em 1937, e em sequência foi purificada de uma vasta gama de plantas e frutas. Ela é responsável por catalisar exclusivamente reações de oxidação de catecóis (*o*-difenois) à suas quinonas correspondentes, levando a redução do oxigênio à água. Esta atividade é conhecida como atividade de catecolase (Esquema 1).¹⁰



Esquema 1 - Reação de oxidação catalisada pela catecol oxidase.¹⁰

As quinonas são espécies bastante reativas, e sofrem uma reação de autopolimerização formando um pigmento polifenólico marrom conhecido como melanina. Além da sua função natural, a reação de oxidação de catecóis é de interesse para diagnóstico médico na quantificação de catecolaminas hormonais (adrenalina, noradrenalina e dopamina).¹¹

O mecanismo da reação de oxidação catalisada pela catecol oxidase ainda não está totalmente elucidado. Em 1996, Solomon propôs o mecanismo mais aceito atualmente. Nesta proposta, o substrato coordena-se à enzima de forma bidentada, formando durante o ciclo catalítico duas moléculas da respectiva quinona e de água (Esquema 2).¹⁰



Esquema 2 – Mecanismo proposto por Solomon para a oxidação do catecol.¹⁰

Estudos revelam que a distância de ligação Cu(II)–Cu(II) é mais curta na catecol oxidase do que em outras proteínas de cobre do tipo III, como por exemplo a hemocianina e a tirosinase. Em contraponto, a catecol oxidase é uma enzima bastante específica, limitada apenas à conversão de *o*-difênóis a suas respectivas *o*-

quinonas.¹¹ A massa molecular da catecol oxidase varia conforme sua origem, porém pode-se adotar como faixa de peso molecular de 38-45 KDa. A enzima possui uma forma elipsoidal de dimensões de 55 x 45 x 45 Å, apresentando uma estrutura secundária dominada por regiões de α -hélices,¹⁰ como representado na Figura 2.

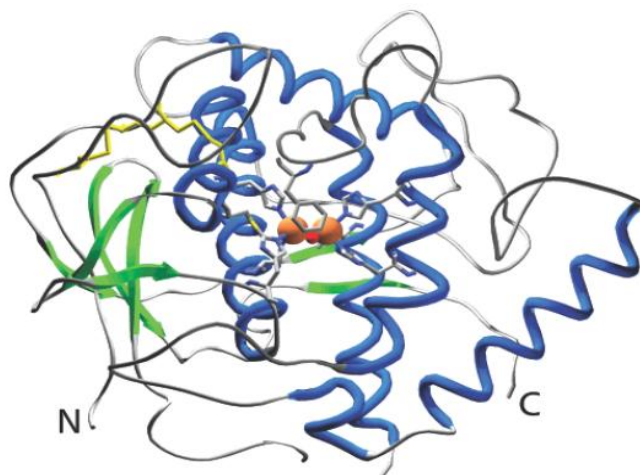


Figura 2 – Estrutura da catecol oxidase. Em laranja os átomos de cobre, alfa hélices em azul, folhas beta em verde e ligações dissulfeto em amarelo.¹⁰

Para elucidar as propriedades catalíticas da catecol oxidase, compostos miméticos de baixa massa molecular vem sendo estudados, e a síntese destes compostos inicia-se com a elaboração de um ligante que possua funções orgânicas semelhantes com as encontras nos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima.¹⁰

2.4 Ligantes para modelagem biomimética

Assim como em complexos simples, onde a tendência de formação está diretamente relacionada à associação de propriedades químicas do ligante e do metal, também ocorre no sítio ativo das metaloenzimas, onde os resíduos de aminoácidos atuam como ligantes que se coordenam através de seus sítios doadores aos íons metálicos. Uma grande variedade de metaloenzimas possui em seus sítios ativos ácidos como Mn^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , e o que se observa é que esses sítios ativos são majoritariamente compostos por resíduos de aminoácidos N-doadores.¹² Haja vista que sítios nitrogenados possuem, de forma geral, um caráter mais macio segundo a teoria de Pearson, podem se coordenar mais facilmente a esses metais considerados de fronteira na escala de maciez e dureza.¹³

Complexos oligonucleares de diversos metais, incluindo o cobre, podem ser sintetizados através de ligantes polidentados. Em geral, ligantes potenciais para a síntese de compostos biomiméticos contêm grupos doadores de elétrons, como piridinas, imidazóis, e álcoois, por exemplo, onde os átomos de nitrogênio e oxigênio estão disponíveis para a coordenação.¹³ Os aminoácidos presentes no sítio ativo da catecol oxidase são histidinas, com átomos de nitrogênio atuando como bases. Uma outra característica de seu sítio ativo é a presença de uma ponte μ -hidróxido entre os átomos de cobre na forma oxidada.¹⁴ Na bioinorgânica ligantes N-doadores são utilizados para modelar sítios ativos de enzimas que também possuam aminoácidos N-doadores.^{14,15} Outra importante característica dos ligantes em compostos miméticos é a utilização de ligantes quelantes, pois estes apresentam vantagens ao se coordenarem aos íons metálicos por formar complexos termodinamicamente mais estáveis, e a estabilidade dos complexos é uma característica fundamental na caracterização e aplicação dos compostos miméticos.¹⁶

2.5 Propriedades dos compostos de coordenação com atividade de catecolase

A presença de centros binucleares de cobre na enzima catecol oxidase tem induzido químicos de coordenação a sintetizar e caracterizar complexos binucleares de cobre como análogos para este sistema natural,² porém, atividade significativa de catecolase também é conhecida em um grande número de complexos mononucleares de cobre. A atividade catalítica de complexos mononucleares pode ser adaptada ao se variar a geometria e os efeitos estéricos ao redor do centro metálico.¹⁷ A determinação das propriedades dos complexos e sua comparação com as propriedades das enzimas contribui na elucidação de aspectos estruturais e funcionais ainda não totalmente esclarecidos nos sistemas biológicos.²

É importante ressaltar que para o mecanismo proposto na oxidação de catecóis pela enzima, antes da transferência de elétrons, os átomos de oxigênio do catecol se ligam ao centro metálico Cu-Cu, neste momento há formação de uma espécie intermediária dicobre-catecolato, reforçando que a proximidade entre dois centros de cobre é uma necessidade na enzima, bem como em sistemas modelo.^{8,18} Isto é válido para mostrar que compostos binucleares de cobre são mais ativos na oxidação de catecóis que compostos mononucleares.¹⁹ Porém a distância

internuclear em complexos binucleares é um fator limitante na catálise, pois complexos onde essa distância é maior do que 5 Å mostram pouca atividade catalítica.⁸ Uma observação pertinente é que complexos mononucleares de cobre (II) que são planares mostram pouca atividade de catecolase quando comparados a outros ambientes de coordenação facilmente redutíveis. Assim, pode-se afirmar que a atividade catalítica dos complexos correlaciona-se diretamente com os seus potenciais de redução.⁸

A hipótese da formação de um intermediário bidentado dicobre-catecolato na primeira etapa da reação surgiu em 1985, no entanto, quase ao mesmo tempo outras pesquisas propuseram que a reação prossegue através da transferência catalítica de um elétron do catecol para o íon cobre, resultando na formação de uma espécie intermediária semiquinona. Estudos relataram que a atividade de catecolase mais elevada foi observada para os complexos que se ligam ao catecolato de maneira bidentada em forma de ponte, porém o substrato pode ligar-se de diversas maneiras ao centro metálico (Figura 3).⁸

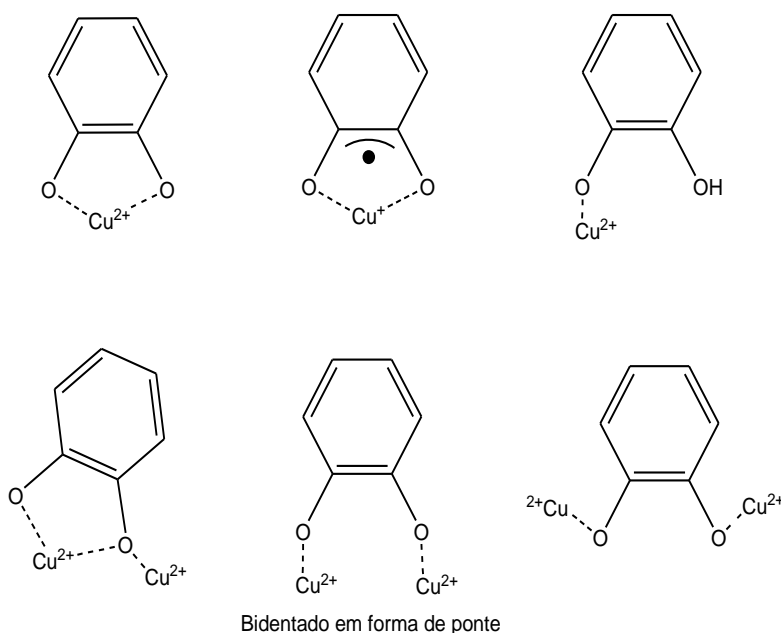


Figura 3 – Possíveis modos de ligação do centro de cobre no substrato catecol desprotonado.⁸

Haja vista a importância apresentada deste trabalho, destaca-se a partir de então a vertente bioinorgânica que engloba a projeção e obtenção de um complexo

modelo funcional para a enzima catecol oxidase na oxidação de catecóis. A obtenção de um composto modelo inicia-se com a projeção de uma molécula orgânica que atuará como ligante para o centro metálico. Este ligante possui funções químicas semelhantes às presentes no sítio catalítico da enzima. Após as caracterizações do ligante parte-se para a obtenção de um composto de coordenação através da complexação com metais, este deve mimetizar as propriedades físico-químicas da metaloenzima de interesse. A atividade catalítica do complexo deve ser testada, e a partir destas informações é possível considerá-lo ou não um bom modelo estrutural e/ou funcional para a enzima de interesse.

Em resumo, o estudo de um complexo mononuclear de cobre(II) visa contribuir para informações a respeito do mecanismo da catálise enzimática realizada pela catecol oxidase, e com análises que evidenciem as propriedades de um composto modelo funcional deste sistema.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar um ligante não-simétrico e seu respectivo complexo de Cu(II), a fim de testar suas atividades de catecolase frente ao substrato modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol. Por fim, fazer o estudo comparativo das propriedades do novo composto de coordenação sintetizado com as propriedades da metaloenzima catecol oxidase, para propô-lo como modelo funcional para oxidação de catecóis.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o ligante não-simétrico N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)-propano-1,3-diamina - H₁L₁;
- Obter um novo complexo de Cu(II) utilizando o ligante sintetizado;
- Caracterizar o ligante H₁L₁ por espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C, e espectrometria de massas;
- Caracterizar o complexo sintetizado por espectrometria de massas, espectroscopia na região do infravermelho e na região do visível (UV-vis), condutimetria, eletroquímica e titulação espectrofotométrica;
- Realizar estudos cinéticos de atividade de catecolase do complexo frente ao substrato modelo 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC);
- Fazer o estudo comparativo das propriedades do novo composto de coordenação sintetizado com as da enzima catecol oxidase quanto à capacidade oxidativa.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e Reagentes

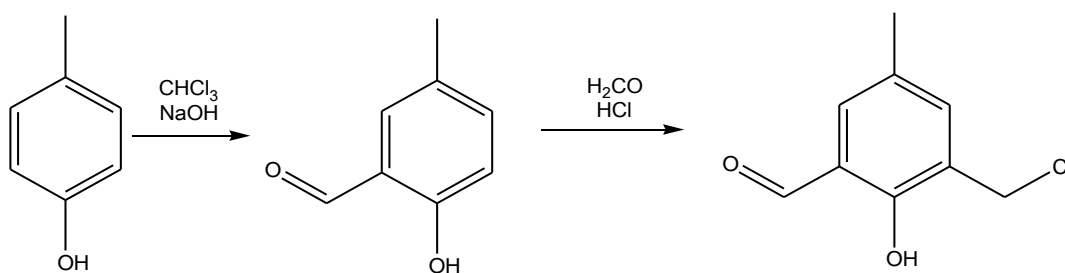
As sínteses e caracterizações do ligante e complexo, assim como os estudos cinéticos envolveram os reagentes, solventes e materiais descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Materiais, reagentes e solventes utilizados.

Materiais/Reagentes/Solventes	Marca	Pureza
2-piridilcarboxialdeído	Aldrich	Destilado sob pressão reduzida
1,3-propanodiamina	Aldrich	Destilado sob pressão reduzida
Ácido trifluoroacético	Fluka	Destilado sob pressão reduzida
Tetrahidrofurano	Vetec	Seco através de refluxo com sódio metálico
Metanol	Vetec	99,8 %
Etanol	Vetec	95,0 %
Éter etílico	Vetec	97,0 %
Acetona	Vetec	99,5 %
Diclorometano	Vetec	99,5 %
Borohidreto de sódio	Aldrich	99,0 %
Cianoborohidreto de sódio	Aldrich	95,0 %
Peneira molecular 4 Å	Aldrich	-
Sulfato de sódio anidro	Vetec	99,0 %
Cloreto de potássio	Vetec	99,0 %
Hidróxido de sódio	Vetec	99,0 %
Hidrogenocarbonato de sódio	Nuclear	99,7 %
Acetonitrila UV/HPLC	Tedia	99,9 %
Metanol UV/HPLC	Tedia	99,9 %
Clorofórmio deuterado	Aldrich	99,8 %
Gás hidrogênio	White-Martins	Analítico
Brometo de potássio	Aldrich	>99 %
3,5-DTBC	Aldrich	Recristalizado em hexano
MES	Aldrich	99,5 %

TRIS	Aldrich	99,0 %
Perclorato de cobre	Aldrich	98,0 %
Pd/C	Aldrich	-
<i>p</i> -cresol	Aldrich	98,0 %
Formaldeído	Synth	90,0 %
Ácido clorídrico	Vetec	37,0 %
Hidróxido de potássio	Aldrich	85,0 %
Sódio metálico	Fluka	-

O reagente 2-clorometil-4-metil-6-formifenol foi sintetizado em laboratório pela reação entre o *p*-cresol com hidróxido de sódio em clorofórmio, seguido da reação com o formaldeído em ácido clorídrico, segundo descrito na literatura,²⁰ e conforme o Esquema 3.

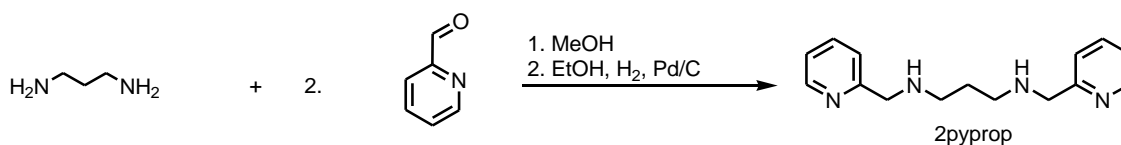


Esquema 3 – Rota sintética do CMFF.

4.2 Sínteses

Para a síntese do ligante H_1L_1 foi utilizada a metodologia sintética descrita por Terra.²¹ Já para a síntese do complexo foi desenvolvida uma metodologia através da reação direta de perclorato de cobre(II) com o ligante sintetizado em proporção estequiométrica.

4.2.1 Síntese do N,N'-bis(2-metilpiridil)-propano-1,3-diamina – 2pyprop



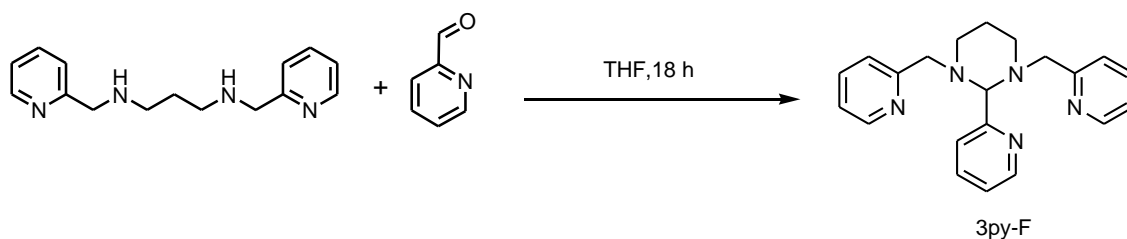
Esquema 4 – Rota sintética do 2pyprop.

A amina 2pyprop foi obtida a partir da adição lenta da 1,3-propanodiamina (11,88 mmol; 0,88 g; 1,0 mL, 0,88 g mL⁻¹, 74,08 g mol⁻¹) dissolvida em 10 mL de metanol, sobre uma solução metanólica do 2-piridilcarboxialdeído (23,6 mmol; 2,53 g; 2,25 mL; 1,126 g mL⁻¹; 107,11 g mol⁻¹) de volume igual a 50mL (Esquema 4). O sistema foi mantido sob agitação magnética e banho de gelo durante a adição, sendo a agitação mantida por quatro horas após o término da adição. Após o tempo de reação o solvente foi removido sob pressão reduzida, e a hidrogenação foi realizada utilizando etanol como solvente. Condições de hidrogenação: 45 psi, 15 h, 1,66 g de Pd/C como catalisador. Transcorrido o tempo da hidrogenação, o catalisador foi filtrado e o solvente removido sob pressão reduzida. O produto foi obtido na forma de um óleo amarelado, com rendimento de 78,2% e foi caracterizado por espectroscopia no IV e RMN ¹H.

IV (KBr) em cm⁻¹: ν (N-H) 3301; δ (N-H) 1591; ν (C-H_{ar}-C-H_{alif}) 2927-2831; ν (C=C e C=N) 1590-1570 e δ (C-H_{ar}) 765.

RMN ¹H - δ H (200 MHz; CDCl₃; ppm): 8,54-8,52 (d, 2H_{ar}); 7,66-7,58 (t, 2H_{ar}); 7,32-7,28 (m, 2H_{ar}); 7,17-7,11 (d, 2H_{ar}); 3,90 (s, 4H_{alif}); 2,78-2,71 (t, 4H_{alif}); 2,60 (2H, NH); 1,85-1,69 (m, 2H_{ar}).

4.2.2 Síntese do 2-piridil-1,3-bis(2-piridilmetil)hexahidropiridina – 3py-F



Esquema 5 – Rota sintética do 3py-F.

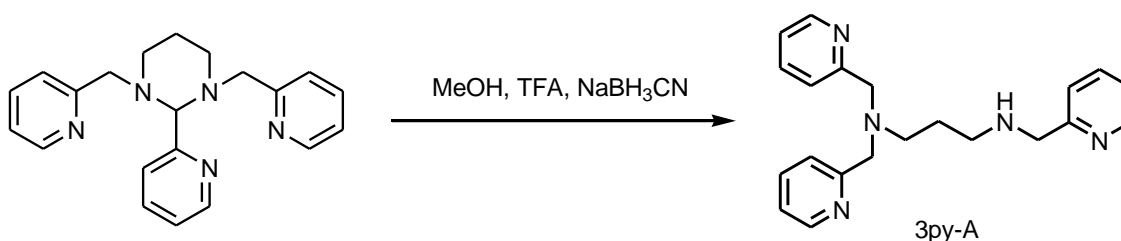
O composto 3py-F foi preparado a partir de uma reação de condensação do 2pyprop com o 2-piridilcarboxialdeído. A reação de ciclização foi realizada adicionando o 2-piridilcarboxialdeído (9,20 mmol; 0,98 g; 0,87 mL; 1,126 g mL⁻¹; 107,11 g mol⁻¹) sob o 2pyprop (9,20 mmol, 2,38 g, 256,17 g mol⁻¹) previamente solubilizado em 20 mL de THF seco e na presença de peneira molecular de 4 Å. O sistema foi mantido sob agitação durante 22 h utilizando tubo secante como proteção. Posteriormente, a peneira molecular e o THF foram removidos e adicionou-se éter etílico ao produto que precipitou em um sólido branco

instantaneamente. O sólido foi recristalizado com acetona à quente e lavado com éter etílico gelado. O 3py-F foi obtido com 62,0% de rendimento em relação ao 2pyprop e caracterizado por P.F., IV e RMN ^1H . P.F: 128,4 – 130,3 °C, literatura: 130,1 – 130,6 °C.²²

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (C-H_{ar}-C-H_{alif}) 3058- 2815; ν (C=C e C=N) 1595-1563 e δ (C-H_{ar}) 753.

RMN ^1H - δH (200 MHz; CDCl_3 ; ppm): 8,56-8,53 (d, 1H_{ar}); 8,45-8,43 (d, 2H_{ar}); 7,94-7,90 (t, 1H_{ar}); 7,40-7,55 (m, 3H_{ar}); 7,44-7,05 (m, 5H_{ar}); 4,07 (s, 1H_{alif}); 3,64-3,57 (d, 2H_{alif}); 3,38-3,31 (m, 2H_{alif}); 3,08-3,02 (m, 2H_{alif}); 2,38-1,55 (m, 4H_{alif}).

4.2.3 Síntese do N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-propano-1,3-diamina – 3py-A



Esquema 6 – Rota sintética do 3py-A.

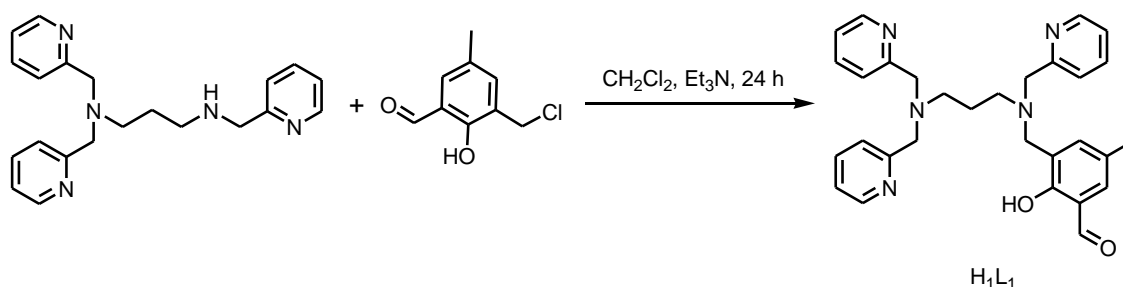
Após ser isolado e caracterizado o 3py-F sofreu uma reação de abertura do anel conforme mostra o Esquema 6. A abertura foi realizada a partir de 1,97 g do 3py-F (5,70 mmol; 346,43 g mol⁻¹), previamente solubilizado em 30 mL de metanol. Ao meio reacional em agitação e banho de gelo foram adicionados 0,9 mL de TFA (11,45 mmol; 114 g mol⁻¹; 1,30 g; 1,489 g mL⁻¹) e 0,38 g de NaBH₃CN (6,13 mmol; 62,84 g mol⁻¹). O sistema foi protegido com tubo secante e a agitação foi mantida por uma noite.

Em seguida, foram adicionados 5,0 mL de NaOH 15% (m/v) e o sistema foi mantido por agitação durante 3 h. Após o tempo de reação, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e água destilada foi adicionada. Após, o pH foi corrigido até aproximadamente 9. Posteriormente o produto foi extraído com CH₂Cl₂ (5 x 30 mL), e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida originando um óleo amarelado com 89,5% de rendimento em relação ao 3py-F. O produto foi caracterizado por IV e RMN ^1H .

IV (KBr) em cm^{-1} : ν (N-H) 3423; δ (N-H) 1589; ν (C-H_{ar}-C-H_{alif}) 3073- 2722; ν (C=C e C=N) 1562 e δ (C-H_{ar}) 774.

RMN ^1H - δH (200 MHz; CDCl_3 ; ppm): 8,51-8,49 (d, 3H_{ar}); 7,66-7,59 (m, 3H_{ar}); 7,51-7,47 (m, 2H_{ar}); 7,33-7,15 (m, 1H_{ar}); 7,12-7,10 (m, 3H_{ar}); 3,89 (s, 2H_{alif}); 3,81 (s, 4H_{alif}); 3,89 (s, 2H_{alif}); 3,81 (s, 4H_{alif}); 2,98 (1H, NH); 2,73-2,60 (m, 4H_{alif}); 1,84-1,77(m, 2H_{alif})

4.2.4 Síntese do ligante N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)-propano-1,3-diamina – H_1L_1



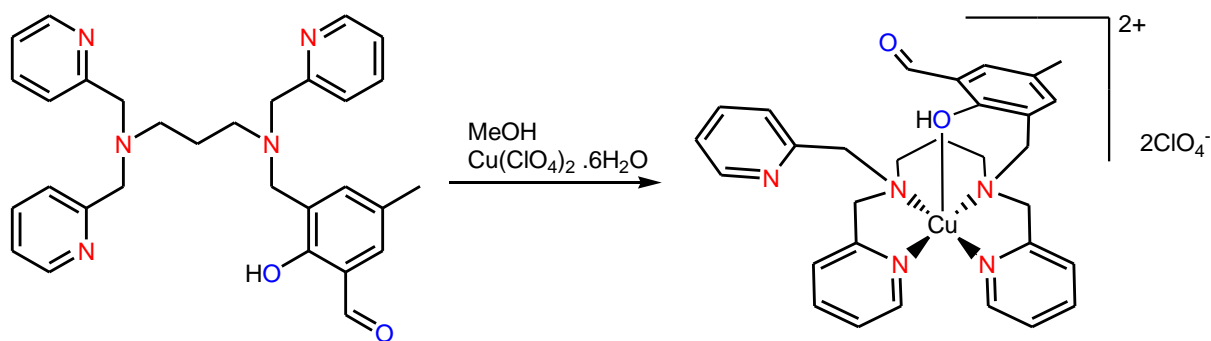
Esquema 7 – Rota sintética do ligante H_1L_1 .

O ligante H_1L_1 foi preparado a partir de uma reação $\text{S}_{\text{N}}2$ entre o 3py-A e o CMFF. A síntese foi realizada a partir de 0,94 g do reagente CMFF (5,10 mmol; $184,03 \text{ g mol}^{-1}$) dissolvidos em 20 mL de CH_2Cl_2 contendo Et_3N (0,80 mL; 5,72 mmol; $0,56 \text{ g}$; $0,726 \text{ g mL}^{-1}$; $101,1 \text{ g mol}^{-1}$) sob agitação, e a esta solução foi adicionado lentamente o 3py-A (5,10 mmol; $1,77 \text{ g}$; $347,46 \text{ g mol}^{-1}$). O sistema foi mantido sob banho de gelo durante toda a etapa de adição (aproximadamente 3 h). O banho de gelo foi retirado e a agitação continuou até que se completassem 24 h de reação. Posteriormente a mistura reacional foi lavada aproximadamente 10 vezes com alíquotas de 25 mL de solução saturada de NaHCO_3 até se tornar límpida e incolor. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, e após a remoção do solvente sob pressão reduzida obteve-se um óleo amarelo escuro com 94% de rendimento em relação ao 3py-A. O produto foi caracterizado por ESI-MS, IV, RMN ^1H e ^{13}C . ESI-MS $m/z = [496,26]^+$. IV (KBr) em cm^{-1} : ν (O-H) 3432; ν (C- H_{ar} -C- H_{alif}) 3060-2828; ν (C=O) 1675; ν (C=C e C=N) 1590-1569; δ (O-H) 1367; δ (C- O_{fenol}) 1220; ν (C- H_{ar}) 758.

RMN ^1H - δH (200 MHz; CDCl_3 ; ppm): 10,28 (s, 1H_{alif}); 8,55-8,48 (d, 3H_{ar}); 7,65-7,54 (m, 3H_{ar}); 7,32-7,28 (m, 4H_{ar}); 7,14-7,10 (m, 4H_{ar}); 3,79 (s, 2H_{alif}); 3,74 (s, 6H_{alif}); 2,61-2,50 (m, 4H_{alif}); 2,24 (s, 3H_{alif}); 1,85-1,78 (m, 2H_{alif}).

RMN ^{13}C - δC (200 MHz; CDCl_3 ; ppm): 192,22 (1C- H_{alif}); 159,86-121,75 (14C- H_{ar} , 7C $_{\text{ar}}$); 60,39-51,68 (6C- $\text{H}_{2\text{alif}}$); 23,87 (1C- $\text{H}_{2\text{alif}}$); 20,21 (1C- $\text{H}_{3\text{alif}}$).

4.2.5 Síntese do complexo Perclorato de {N,N,N'- tris(2-metilpiridil)-N'(2-fenol-5-metilbenzaldeído) propano-1,3-diamina}cobre(II) - $[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L}_1)] (\text{ClO}_4)_2$



Esquema 8 – Rota sintética do complexo $[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L}_1)](\text{ClO}_4)_2$.

O complexo foi sintetizado adicionando o H_1L_1 (0,139 g; 0,281 mmol; $495,62 \text{ g mol}^{-1}$) dissolvido em metanol sob uma solução também metanólica de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,104 g; 0,281 mmol; $370,54 \text{ g mol}^{-1}$) segundo o esquema 8. Após a adição de metade da solução do H_1L_1 iniciou-se a precipitação do complexo, que continuou até o fim da adição do ligante. Posteriormente a mistura reacional foi filtrada, obtendo-se um pó verde como complexo. O complexo foi caracterizado por espectroscopia no IV, ESI-MS, espectroscopia eletrônica na região do UV-vis, voltametria cíclica, condutivimetria, e titulação espectrofotométrica. A atividade de catecolase do complexo foi testada frente ao substrato modelo 3,5 DTBC.

4.3 Métodos de Caracterização

4.3.1 Ponto de Fusão

O ponto de fusão foi determinado em um equipamento Buchi Melting Point B-540 no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC) do Departamento de Química – UFSC.

4.3.2 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR Spectrofotometer Spectrum, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC) do Departamento de Química – UFSC. As amostras foram preparadas por dispersão da amostra em KBr de grau espectroscópico e prensadas na forma de pastilhas, que foram introduzidas no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância (%T).

4.3.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio RMN ^1H e Carbono ^{13}C

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos foram obtidos em espectrofotômetros Bruker – AC 200 MHz na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Os deslocamentos químicos de hidrogênio (δ) foram registrados em ppm tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,00$ ppm), e utilizando como solvente deuterado CDCl_3 .

4.3.4 Espectroscopia Eletrônica (UV-Vis)

Os espectros eletrônicos na região do Ultravioleta e Visível foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda 750, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), do departamento de Química – UFSC. As análises foram realizadas utilizando solventes de grau espectroscópico (HPLC), cubetas de quartzo com capacidade máxima de 1,0 mL e 1,0 cm de caminho óptico. A reflectância difusa foi realizada no mesmo equipamento através de módulo acoplável, onde a amostra foi dispersa em pastilha de KBr espectroscópico.

4.3.5 Espectrometria de Massas

Os compostos H_1L_1 e $[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L}_1)](\text{ClO}_4)_2$ foram analisados em um espectrômetro de massas com ionização via eletrospray (ESI–MS) Amazon–IonTrap –MS do Centro de Biologia Molecular (CEBIME) – UFSC. As análises foram realizadas em soluções de CH_3CN e MeOH de grau espectroscópico como solventes, e como diluente nas análises foi utilizado CH_3CN . A concentração da

análise foi em torno de 500 ppb e fluxo de $180 \mu\text{L min}^{-1}$. A temperatura do capilar foi mantida entre 180 e 200 °C e a voltagem entre -400 e -500 V.

4.3.6 Medida Eletroquímica

O comportamento redox do complexo foi investigado por voltametria cíclica em um potenciostato/galvanostato modelo Epsilon no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. Os experimentos foram feitos em H_2O , com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sob atmosfera de argônio. Foi utilizado como eletrólito suporte, NaClO_4 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e uma célula eletrolítica contendo um eletrodo de referência comercial de Ag/AgCl (BASi), um eletrodo de trabalho de carbono vítreo e um eletrodo auxiliar de platina.

4.3.7 Titulação Espectrofotométrica

O equilíbrio de espécies do complexo foi estudado através de uma titulação espectrofotométrica realizada em um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostaticado (25°C) no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo com capacidade máxima de 1,0 mL e caminho óptico de 1,0 cm. A variação de pH foi acompanhada através de um pHmetro da marca BEL, calibrado com soluções tampão 4,0; 6,86; e 9,0. O pH foi ajustado através da adição de KOH e HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. A solução do complexo foi feita em $\text{H}_2\text{O/CH}_3\text{CN}$ (1:1) com concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e a força iônica do meio foi mantida constante com a adição de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após cada leitura do espectro eletrônico, a solução retornava para a célula termostaticada, a fim de evitar efeitos de diluição.

4.3.8 Condutimetria

As medidas de condutividade molar do complexo foram realizadas no aparelho Metrohm 856, do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC. O complexo foi analisado em dois solventes (CH_3CN , MeOH), com concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O aparelho foi calibrado com uma solução padrão de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ cuja condutividade é de $100 \mu\text{S/cm}$ em água a 25°C .

4.3.9 Cinética de Oxidação

A atividade catalítica do complexo foi avaliada através da reação de oxidação do substrato 3,5-di-*tert*-butilcatecol (3,5-DTBC). Os experimentos cinéticos foram realizados sob condições de excesso de substrato em um espectrofotômetro UV-vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatzado (25°C), no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), do departamento de Química – UFSC. Monitorou-se espectrofotometricamente a variação de absorbância ocorrida em 400 nm ($\epsilon = 1645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), devido a formação da 3,5-di-*tert*-butilquinona (3,5-DTBQ).

Estudos em função do pH (4,0-10,0) para a atividade de catecolase do complexo foram realizados em triplicata e com concentração fixa de substrato. Utilizaram-se cubetas de vidro óptico com capacidade para 4000 μL e caminho óptico de 1,0 cm, fechadas com tampa de teflon, onde foram adicionados nesta ordem, 100 μL de solução aquosa ($[\text{C}]_{\text{final}} = 5,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) dos tampões: (MES pH 4,0 a 6,5 e TRIS pH 7,0 a 10,0), 1350 μL de metanol saturado com oxigênio, 200 μL de uma solução metanólica do substrato ($[\text{C}]_{\text{final}} = 5,88 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 50 μL de solução do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 2,94 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi monitorada durante 15 minutos. Em todos os experimentos, o volume final da mistura reacional na cubeta foi de 1,7 mL.

Os experimentos de efeito da concentração de substrato foram realizados em triplicata e com variação da concentração de substrato ($2,94 \times 10^{-4} - 2,35 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). A concentração do complexo ($[\text{C}]_{\text{final}} = 1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e tampão TRIS ($[\text{C}]_{\text{final}} = 5,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram mantidas constantes, e variou-se a adição de metanol saturado com oxigênio, de maneira que o volume final da cubeta foi de 1,7 mL em todas as medidas. Correções da oxidação espontânea do substrato 3,5 – DTBC foram realizadas sob condições idênticas, sem a adição do complexo. As velocidades iniciais foram obtidas da inclinação da curva da absorbância vs o tempo nos primeiros minutos da reação, pelo método das velocidades iniciais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do ligante N,N,N'-tris(2-metilpiridil)-N'(2-hidróxi-5-metilbenzaldeído)-propano-1,3-diamina

Neste trabalho foi sintetizado o ligante mononucleante H_1L_1 conforme rota sintética descrita na seção 4.2. O ligante foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ressonância nuclear de hidrogênio e carbono, e espectrometria de massas, e apresentou grau de pureza adequado para a realização da síntese do complexo.

5.1.1 Espectroscopia no Infravermelho – IV

Em todas as etapas os produtos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho e as principais bandas foram atribuídas, com os espectros de infravermelho em conjunto com as outras análises, foi possível acompanhar a formação dos compostos em cada etapa da reação. Na primeira etapa de síntese, a formação do 2pyprop pode ser caracterizada principalmente pela banda de amina secundária, e pelo não aparecimento das bandas de estiramento carbonila e amina primária que estão presentes nos reagentes. A banda de amina secundária também caracteriza que a redução da imina ocorreu.

As aminas primárias e secundárias fornecem picos pronunciados na região de $3300-3500\text{ cm}^{-1}$, originários de vibrações axiais de estiramento N–H livres. A amina primária fornece dois picos pronunciados originários do estiramento simétrico e assimétrico das duas ligações N–H, e a amina secundária origina apenas uma absorção de estiramento. Para o 2pyprop a deformação axial simétrica aparece em 3301 cm^{-1} e possivelmente sobreposta a uma banda de deformação axial O–H de uma molécula de água devido ao alargamento desta banda. Nas aminas secundárias alifáticas é possível observar com dificuldade a banda de deformação angular entre $1650-1580\text{ cm}^{-1}$,²² para o 2pyprop a deformação angular foi caracterizada em 1595 cm^{-1} .

A formação do 3py-F pôde ser evidenciada nesta técnica pelo desaparecimento da banda de amina secundária presente no reagente, visto que as aminas terciárias não absorvem nesta região do espectro. Novamente o não aparecimento da banda de estiramento C=O indica que todo aldeído reagiu na

formação do produto. A terceira etapa da rota sintética do ligante é a que apresenta menores distinções entre produto e reagente pela técnica de espectrometria no infravermelho, onde a maneira mais significativa de acompanhar a formação do 3py-A é pelo surgimento da banda de amina secundária, que foi caracterizada em 3423 cm^{-1} .

Na obtenção do ligante H_1L_1 ocorreu o surgimento de bandas características, a primeira delas é a de estiramento axial $\text{C}=\text{O}$, esta aparece comumente em aldeídos na região de $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$, porém a presença de insaturação conjugada, como nos aldeídos α,β -insaturados reduz a frequência de absorção da carbonila para aproximadamente $1710\text{-}1685\text{ cm}^{-1}$.²² No ligante H_1L_1 , a banda de estiramento axial $\text{C}=\text{O}$ foi caracterizada em 1675 cm^{-1} . Outra banda característica é a de deformação axial O-H do fenol presente no ligante, a qual foi caracterizada em 3423 cm^{-1} . Os fenóis também absorvem em outras duas áreas, $1390\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ e $1260\text{-}1180\text{ cm}^{-1}$. Estas bandas resultam aparentemente da interação entre a deformação angular de O-H e a deformação axial de C-O .²² No ligante H_1L_1 , estas bandas foram caracterizadas respectivamente em 1367 e 1220 cm^{-1} . A partir destas informações foi possível caracterizar previamente os compostos sintetizados na rota sintética do ligante.

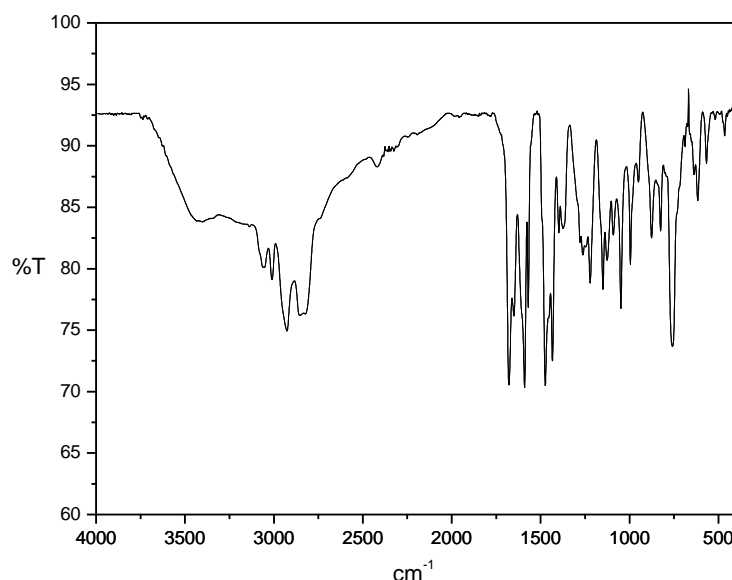


Figura 4 – Espectro de IV do ligante H_1L_1 .

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio – RMN ^1H

A ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente outra forma de espectroscopia de absorção, porém neste caso, a absorção é função de determinados núcleos da molécula, um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades.²²

A interpretação dos espectros de RMN pode ser feita em mais detalhes do que os espectros de infravermelho ou massas, pois os valores de deslocamento químico (δ_{H} em ppm), e o número de átomos de hidrogênio correspondentes podem ser observados. Para o ligante H_1L_1 em todas as etapas de síntese os produtos foram caracterizados por RMN ^1H . As propriedades do espectro são baseadas nos efeitos de blindagem eletrônica sofrida por cada próton a ser caracterizado. Hidrogênios que são quimicamente diferentes absorvem energia em frequências diferentes, uma vez que os hidrogênios em uma molécula são blindados fracamente pelas nuvens eletrônicas que os cercam. A variação do ambiente químico que cerca os hidrogênios em uma molécula dá origem às posições diferentes em que estes aparecem no espectro.²²

Outra interpretação importante nos espectros de RMN de ^1H é o acoplamento de spin, que pode ser descrito como sendo o acoplamento indireto dos spins dos hidrogênios através dos elétrons da ligação. Isto ocorre porque os elétrons da ligação tendem a alinhar o spin com o spin do núcleo mais próximo.²² Outro aspecto a se considerar são as áreas de absorção, que são proporcionais ao número de hidrogênios a que correspondem. A partir destas informações, e observando as estruturas dos compostos, foi possível caracterizar cada produto com o auxílio desta técnica.

Para o 2pyprop, o RMN de ^1H foi usado para certificação de que o produto foi formado, e que não houve sobra de reagentes no composto, mas, além disso, a principal utilização foi para confirmar a redução da imina. Isto pode ser feito pela identificação dos quatro hidrogênios singletes ligados ao carbono vizinho do nitrogênio em 3,90 ppm. Se a redução não houvesse ocorrido, a área correspondente a estes hidrogênios seria 2,0. Para o 3py-F ocorreu um aumento na região aromática devido à presença de mais uma piridina, pois o ambiente químico é diferente das outras duas, e também como principal caracterização o surgimento do pico em 4,07 ppm do hidrogênio singlete que fecha o anel de seis membros que se

forma no 3py-F. Para o 3py-A, após a reação de abertura do anel, a mudança de CH para CH₂ é a principal evidência de que o produto foi formado, este sinal foi observado em 3,89 ppm. É importante ressaltar que os hidrogênios ligados a nitrogênio, oxigênio e enxofre não são hidrogênios que servem como caracterização uma vez que podem sofrer ligações de hidrogênio, e as regiões de deslocamento dependem da concentração, solvente, e temperatura.²²

Na última etapa de síntese o surgimento do pico da metila e do aldeído foram identificados respectivamente em 2,24 e 10,28 ppm conforme a Figura 5. Esta distinção de deslocamento é relativa à blindagem da nuvem eletrônica dos átomos vizinhos sofrida por cada hidrogênio. O hidrogênio do aldeído sofre uma menor blindagem devido à proximidade com o átomo de oxigênio, os hidrogênios seguintes no espectro são os hidrogênios vizinhos do nitrogênio nas piridinas, que também sofrem pouca blindagem e aparecem deslocados dos outros aromáticos (8,55-8,48).

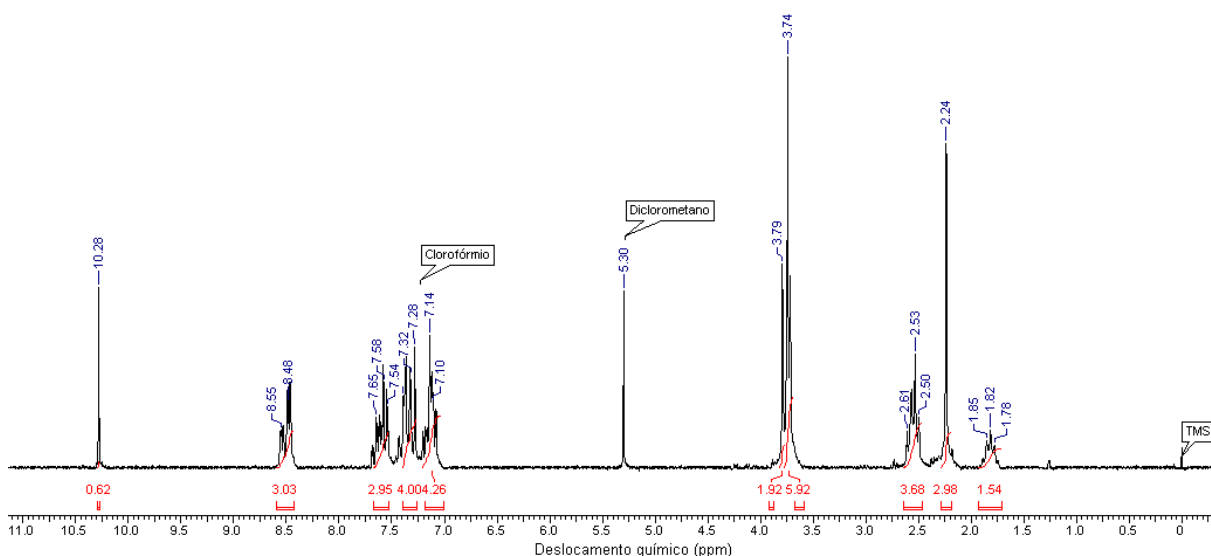


Figura 5 – Espectro de RMN ¹H do ligante H₁L₁.

5.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – RMN ¹³C

Existem diferenças entre as espectroscopias de carbono e hidrogênio, a começar pelo fato de que o núcleo de ¹²C não é magneticamente ativo (número de spin igual a zero), diferentemente dos núcleos de ¹³C e ¹H que possuem número de spin igual a 1/2. Entretanto a abundância do ¹³C é apenas 1,1% da de ¹²C e sua sensibilidade apenas 1,6% da de ¹H.²² Por estes motivos esta análise necessita de mais tempo e uma maior concentração da amostra em relação ao RMN ¹H.

Outra diferença é que nos espectros de ^1H existe uma relação entre as áreas dos picos integrados e o número de hidrogênios, isto porque existe tempo suficiente entre os pulsos para que a relaxação aconteça. Entretanto, nos espectros de ^{13}C , os tempos de relaxação dos núcleos variam muito, eles não relaxam igualmente entre os pulsos, e as áreas dos sinais integrados não correspondem ao número de núcleos.²²

Os deslocamentos químicos no espectro RMN ^{13}C são semelhantes ao do ^1H , apenas o ligante final H_1L_1 foi caracterizado por esta técnica, e o espectro está mostrado na Figura 6. É possível observar como características principais o carbono da função aldeído que aparece no menor deslocamento químico da molécula (192,22 ppm), e o carbono da metila que apresenta maior blindagem (20,21 ppm). Também é possível distinguir a área dos carbonos aromáticos (159,86-121,75 ppm), da área pertencente aos carbonos alifáticos (60,39-20,21 ppm). A quantidade de picos encontrados não corresponde exatamente ao número de carbonos da molécula, pois alguns deles possuem equivalência de deslocamento químico por possuírem ambientes eletrônicos iguais.

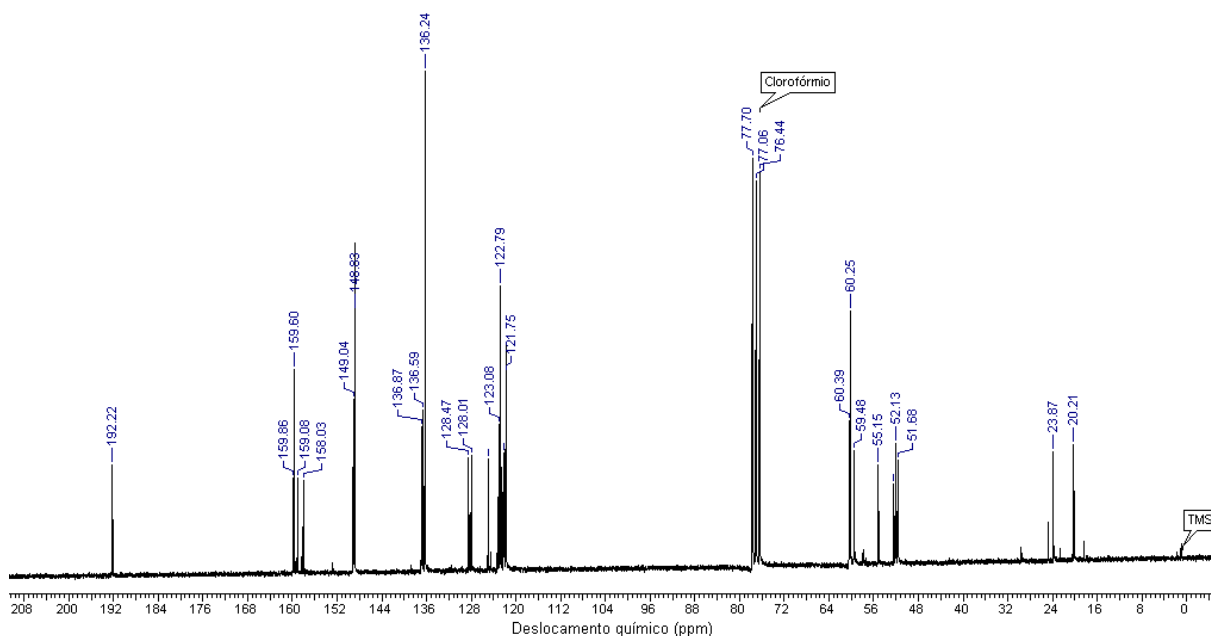


Figura 6 – Espectro de RMN ^{13}C do ligante H_1L_1 .

5.1.4 Espectrometria de Massas – ESI-MS

A espectrometria de massas é uma técnica de impacto de elétrons, onde o resultado é um espectro dos íons da molécula separados na base da razão massa/carga.²² A espectrometria de massas foi realizada apenas com o ligante final H_1L_1 , o espectro de massas bem como o respectivo espectro teórico simulado estão apresentados nas Figuras 7 e 8. Para a realização da medida o ligante foi solubilizado em metanol e diluído em acetonitrila.

O evento mais simples que ocorre em um espectro de massas é a remoção de um elétron da molécula isolada, formando o íon molecular como pico de maior intensidade. No íon molecular pode-se imaginar a carga deslocalizada ou localizada em heteroátomos.²² Neste composto, o pico de maior intensidade tem razão $m/z = 496,26$, que corresponde ao íon da espécie molecular protonada $[496,26]^+$. Em um espectro de massas, além das moléculas com a composição dos isótopos mais abundantes há as espécies moleculares com os isótopos menos abundantes, como por exemplo, ^{15}N , ^{13}C , 2H e ^{17}O .²² A distribuição isotópica feita através do software “*mMass*” possui além do pico do íon molecular os picos com $m/z = 497,27$; $498,27$; $499,27$. Estes picos são referentes aos isótopos encontrados na composição do ligante, e foram coincidentes com o espectro experimental como mostrado na figura 8, confirmando que o ligante foi obtido através da síntese.

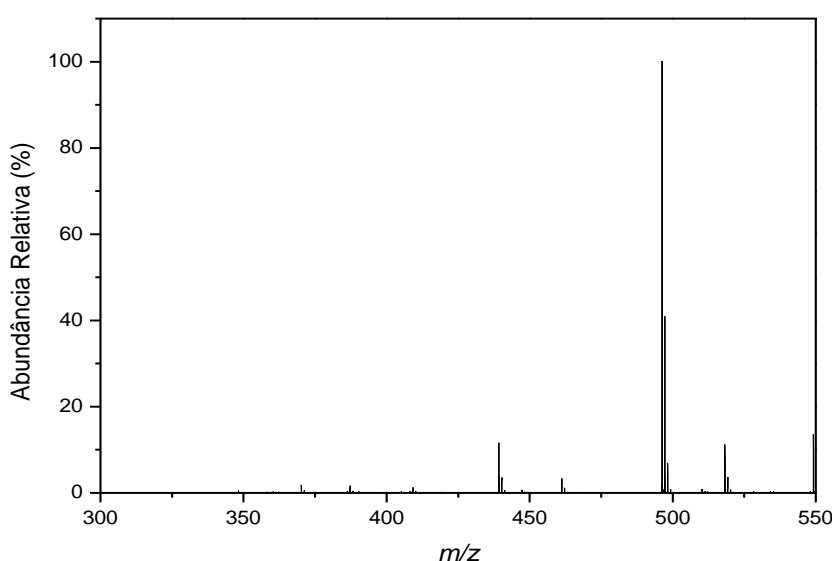


Figura 7 – Espectro de massa experimental do H_1L_1 em MeOH.

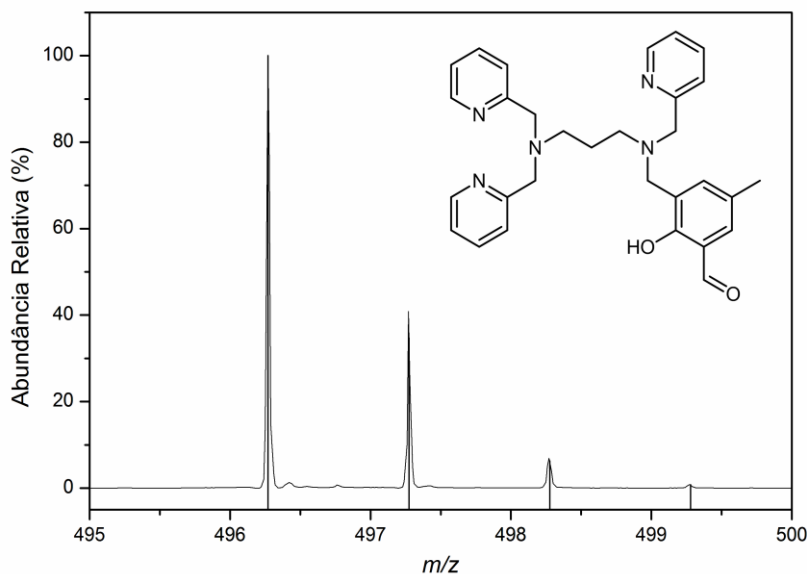


Figura 8 – Simulação de distribuição isotópica sobreposta ao espectro experimental com um sinal de íon molecular $m/z = [496,26]^+$.

5.2 Caracterização do complexo Perclorato de {N,N,N'- tris(2-metilpiridil)-N'(2-fenol-5-metilbenzaldeído) propano-1,3-diamina}cobre(II)

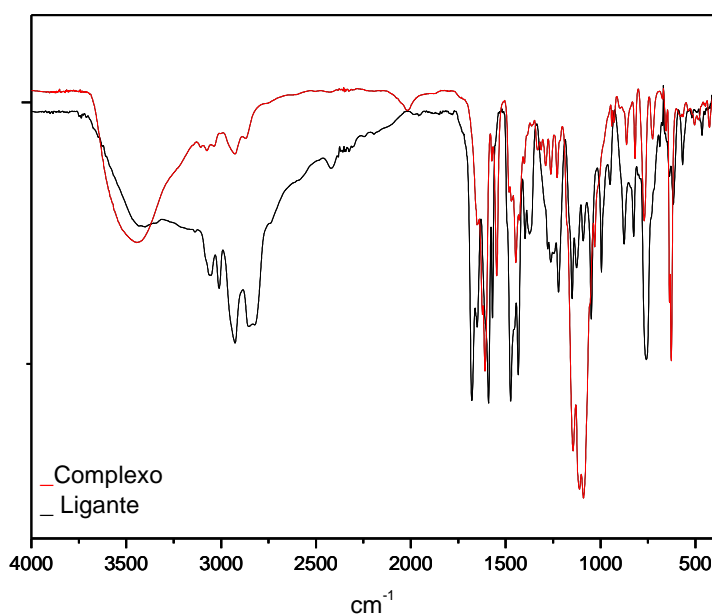
5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho – IV

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada também para a caracterização do complexo, assim foi possível obter informações a respeito da formação e ambiente de coordenação do mesmo. Para complexos, as informações mais relevantes são as diferenças de deslocamento e intensidade das bandas de grupos funcionais do ligante livre e do complexo, sendo assim possível prever se houve a coordenação do ligante na formação do complexo.

O ligante sintetizado H_1L_1 pode coordenar-se de diversas formas ao metal Cu(II) através de seus átomos N,O-doadores presentes, respeitando as preferências de geometria do metal e o efeito Jahn Teller presente no sistema d^9 . A partir da espectroscopia no infravermelho foi possível estimar um ambiente de coordenação para o íon cobre(II) de acordo com os deslocamentos das bandas. As principais bandas e seus deslocamentos estão apresentados na Figura 9 e Tabela 3.

Tabela 3 – Atribuições e deslocamentos químicos no IV para o ligante e complexo.²²

Atribuições	Ligante (cm ⁻¹)	Complexo (cm ⁻¹)
ν (O-H _{fenol})	3442	3439
ν (C-H _{ar} e C-H _{alif})	3060-2828	2924-2856
ν (C=O)	1675	1618
ν (C=N e C=C)	1590-1569	1580-1565
δ (O-H _{fenol})	1367	1287
ν (C-O _{fenol})	1220	1218
δ (C-H _{ar})	761	768

**Figura 9** – Espectro de infravermelho do ligante sobreposto ao do complexo.

Para a coordenação proposta do complexo, os átomos de nitrogênio das aminas e piridinas, e também o oxigênio do fenol estão coordenados ao metal. A

frequência em uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e das geometrias dos mesmos. Quando estes átomos se coordenam ao metal simultaneamente enfraquecem suas ligações com os outros átomos, e como ligações mais fracas se deformam com maior facilidade, uma menor frequência precisa ser fornecida para que essas ligações vibrem. As posições das bandas no espectro de infravermelho são geralmente apresentadas em número de onda (cm^{-1}), sendo esta unidade proporcional à energia de ligação.²²

Foi possível observar a banda de deformação axial O-H para o complexo, isto indica que na coordenação do complexo, há espécies onde fenol permanece protonado. Esta banda aparece em números de onda muito parecidos para o ligante e complexo, isto ocorre porque devido ao efeito Jahn Teller a coordenação na posição apical do íon Cu^{2+} dá-se de maneira não tão efetiva, e assim ocorre pouca influência na força de ligação O-H. A ligação C=N da piridina é enfraquecida quando este nitrogênio coordena-se ao metal, dando a esta ligação uma característica de ligação simples, como esperado, a ligação C=N está deslocada para um menor número de onda no complexo em relação ao ligante.

Para a coordenação principal proposta o oxigênio da carbonila não está coordenado, porém sua banda aparece deslocada aproximadamente 57 cm^{-1} , que é um número relevante em termos de deslocamento. Uma possível explicação é a interação do oxigênio da carbonila com átomos de cobre adjacentes.

5.2.2 Espectroscopia Eletrônica na região do UV-vis

O íon livre Cu(II) possui configuração d^9 , com nove elétrons distribuídos em cinco orbitais d degenerados. Na coordenação do íon Cu(II) pelos ligantes, os orbitais d sofrem uma influência de campo ligante e então se desdobram em diferentes níveis de energia de acordo com a proximidade destes ligantes. Este desdobramento possibilita a ocorrência de transições eletrônicas do tipo d-d, sendo a energia de desdobramento desses orbitais influenciada pela natureza química dos ligantes.²³

As propriedades eletrônicas dos complexos de Cu(II) são fortemente influenciadas pela estereoquímica do complexo. Complexos de cobre(II) em um ambiente octaédrico apresentam uma estereoquímica altamente distorcida em virtude do efeito Jahn Teller. Nesses casos os espectros eletrônicos podem

apresentar até três transições, as quais na maioria das vezes aparecem encobertas em uma única transição alargada na região de 600-700 nm. Já para complexos de cobre pentacoordenados há normalmente duas categorias de geometria: piramidal de base quadrada e bipirâmide trigonal. Os espectros eletrônicos de complexos piramidais de base quadrada mostram tipicamente uma banda de absorção mais intensa em mais alta energia, e um ombro em menor energia. De maneira contrária os complexos bipirâmides trigonais tem como característica uma banda menos intensa em mais alta energia e outra de maior intensidade em menor energia. Estas características tornam a espectroscopia UV-vis uma técnica muito importante na caracterização de complexos de cobre(II), pois fornecem uma série de informações a respeito da esfera de coordenação e geometria da molécula.²⁴

A espectroscopia eletrônica UV-vis baseia-se nas transições eletrônicas que ocorrem nos complexos, estas podem ser de diferentes formas: transições internas d-d ou f-f, transições de transferência de carga ligante-metal ou metal-ligante. Também ocorrem transições conhecidas como intra-ligante, as quais pertencem aos grupos orgânicos cromóforos do ligante. Uma maneira de distinguir os tipos de transições eletrônicas é pelo valor do coeficiente de absorção (ϵ), o qual determina a permissividade com que uma transição eletrônica pode ocorrer. As transições eletrônicas são governadas por duas regras de seleção, a regra de paridade ou de Laporte que diz que transições eletrônicas em complexos que possuem centro de inversão, ou seja, transições eletrônicas para orbitais de mesma simetria são proibidas, e a regra de multiplicidade de spin, que diz que transições eletrônicas que mudam a multiplicidade de spin total não são permitidas. Ambas as regras possuem maneiras de relaxamento, para a regra de Laporte as vibrações moleculares durante as transições, e para a regra de spin o acoplamento spin-órbita, que ocorre principalmente em átomos mais pesados.²⁵

O espectro eletrônico do ligante exibiu uma intensa banda de absorção UV abaixo de 400 nm devido principalmente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ intra-ligante da piridina (Figura 10). Entre 300 e 400 nm vê-se no espectro do complexo um alargamento de banda quando comparado ao ligante, isto porque nesta região ocorre o surgimento, mesmo que muito pequeno, das bandas de transferências de carga ligante-metal, as quais podem ser atribuídas à transição eletrônica $\pi(\text{fenolato}) \rightarrow \text{Cu(II)}$, ou ainda $\sigma(\text{amina}) \rightarrow \text{Cu(II)}$ e $\pi(\text{piridina}) \rightarrow \text{Cu(II)}$.¹⁴

Ao realizar a espectroscopia eletrônica do complexo em diferentes concentrações (Figura 11) foi possível observar uma banda com comprimento de onda máximo de 630 nm, relativo à transição eletrônica interna d-d do Cu^{2+} . De acordo com o espectro em solução do complexo é possível propor que o mesmo se encontra em geometria octaédrica, possivelmente com uma molécula do solvente ocupando a sexta posição. Isto também pode ser afirmado a partir do coeficiente de absorção calculado ($\epsilon = 101 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que é característico de transições eletrônicas permitidas por spin e proibidas por Laporte.²⁶ O desdobramento dos orbitais d sob influência do campo ligante está apresentado na Figura 12.²⁵

A reflectância difusa apresenta transições de campo ligante alargadas e mostra que quando sólido o complexo apresenta um ambiente de coordenação distinto do que quando em solução, pois apresenta um comprimento de onda máximo deslocado para 750 nm (Figura 13). Devido ao alargamento das bandas, não foi possível prever se há transferência de carga no estado sólido por esta técnica. Porém é possível supor que no estado sólido o complexo possui geometria pirâmide de base quadrada, devido ao ombro aparente no espectro na região de menor energia, conforme as propriedades descritas acima.

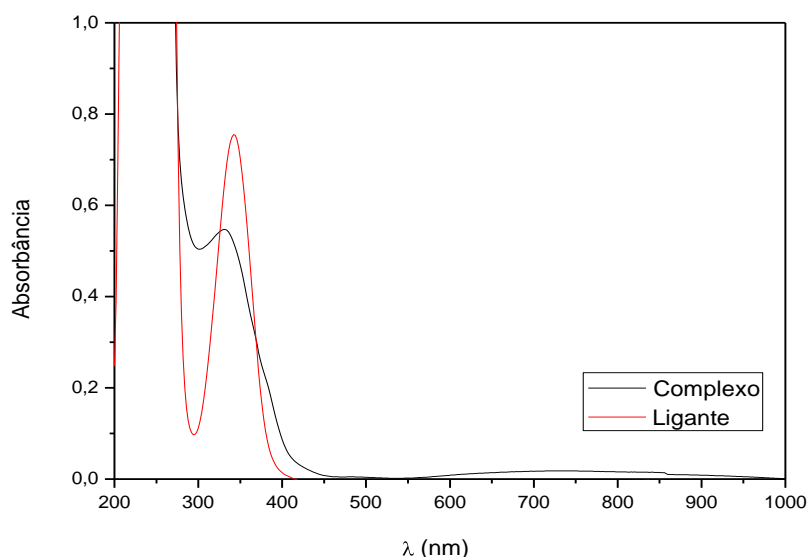


Figura 10 - Espectro UV-vis, em CH_3CN , do ligante e complexo $[\text{C}] = 3,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

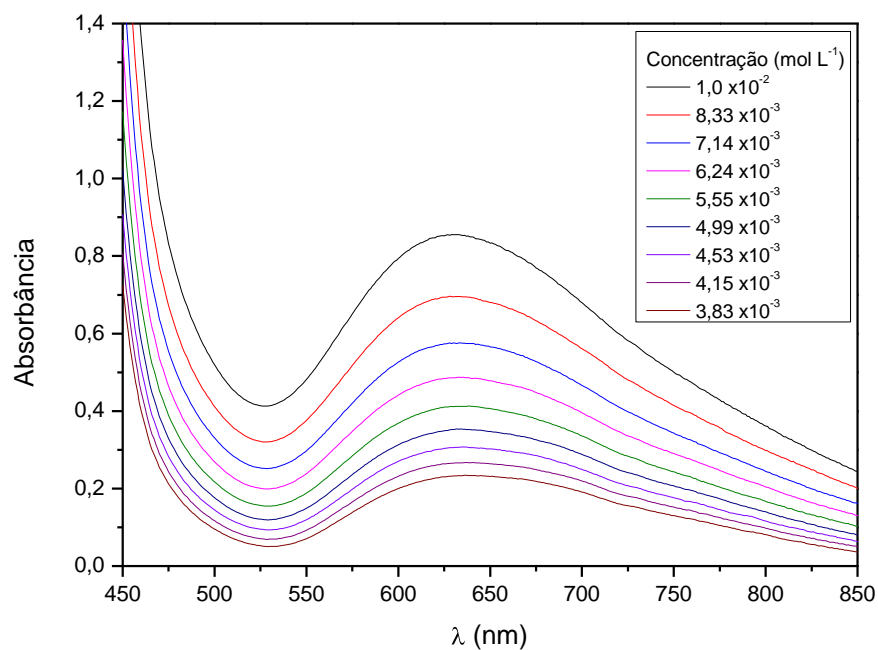


Figura 11 – Espectro UV-vis do complexo [Cu(H₁L₁)](ClO₄)₂ em CH₃CN.

$$\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm e } \epsilon = 101 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

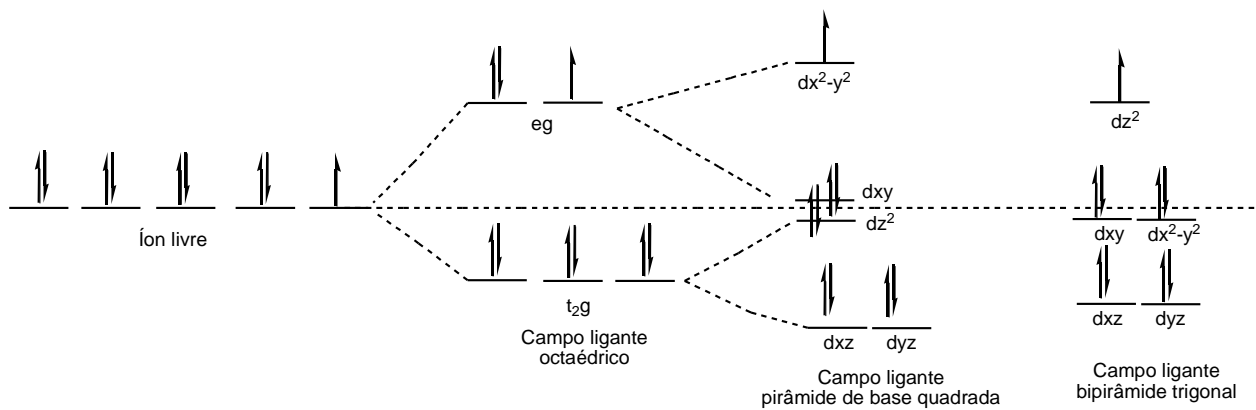


Figura 12 – Desdobramento dos orbitais d em função do campo ligante.²⁵

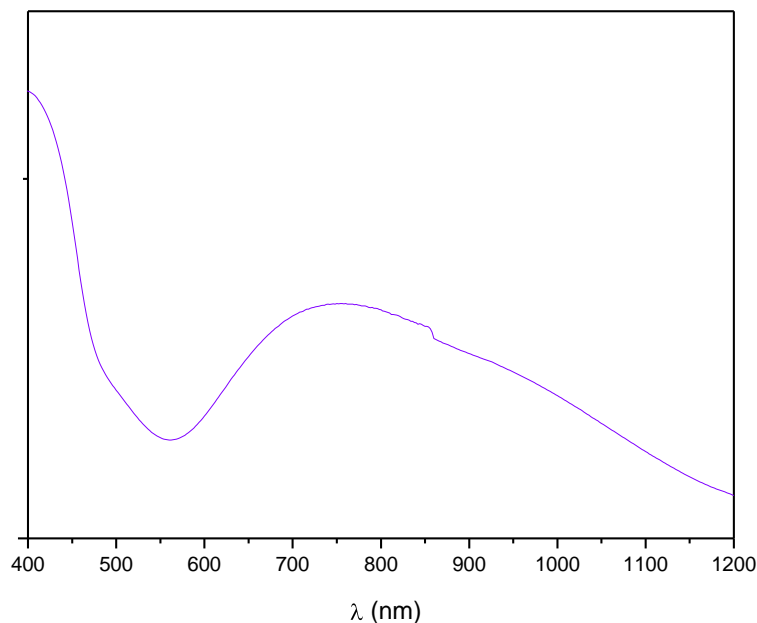


Figura 13 - UV-vis do complexo no estado sólido em pastilha de KBr.

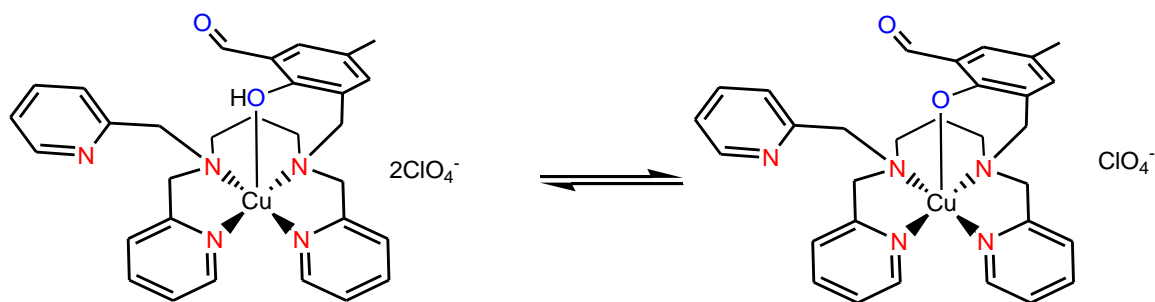
5.2.3 Condutimetria

A condutividade pode ser utilizada para caracterizar compostos de coordenação em solventes orgânicos, considerando algumas propriedades do solvente como viscosidade e constante dielétrica. A partir de efeitos de esfera de coordenação é possível obter a proporção de complexo/contra-íon que há em solução.²⁷ As medidas de condutividade molar para o complexo indicaram que há um equilíbrio de espécies em solução na forma protonada ou não protonada do fenol (Esquema 9). A condutividade molar do complexo foi medida em CH₃CN e MeOH e em uma concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ conforme a Tabela 4.

Devido ao equilíbrio citado, valores intermediários foram encontrados para condutividade, e assim não foi possível identificar com exatidão a proporção de complexo/contra-íon existente em solução.

Tabela 4 – Condutividade do complexo em diferentes solventes.

Solvente	$\Lambda_M (\Omega^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2)$
Acetonitrila	170,31
Metanol	124,8



Esquema 9 – Equilíbrio de espécies em solução.

5.2.4 Espectrometria de Massas – ESI-MS

O espectro de massas experimental do complexo e sua respectiva distribuição isotópica simulada estão apresentados nas Figuras 14 e 15. O pico de maior intensidade representa a espécie majoritária que possui razão $m/z = 557,19$. Este pico é atribuído ao íon molecular do complexo $[C_{30}H_{32}CuN_5O_2]^+$, esta espécie representa que houve a coordenação do ligante ao íon metálico na formação do complexo, e que ocorreu a desprotonação do fenol durante a análise. O espectro de massas do complexo mostra além da composição de maior abundância, os isótopos de menor abundância nos picos de $m/z = 558,19$; $559,19$; $560,19$; e $561,19$. A distribuição isotópica foi simulada pelo software “*Mmass*” e comparada com o espectro experimental. A sobreposição das linhas indica que o complexo foi formado.

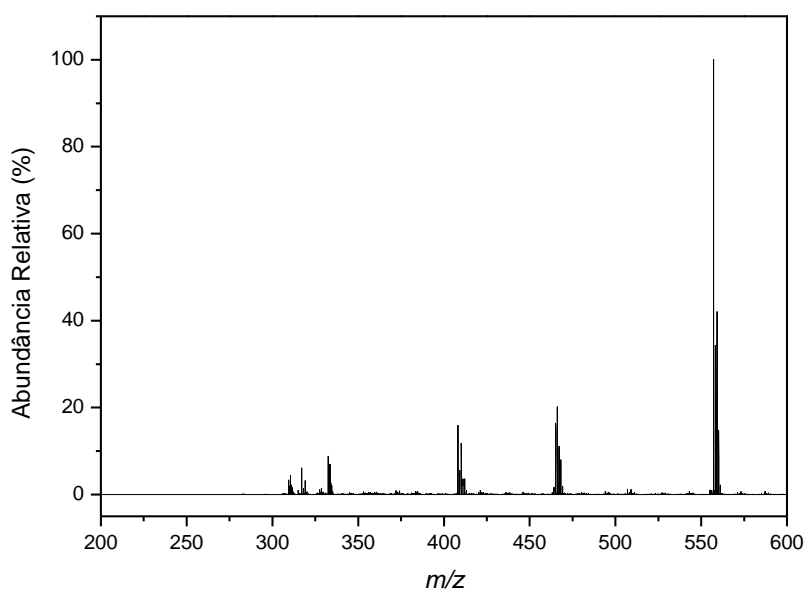


Figura 14 – Espectro de massa experimental do $[Cu(H_1L_1)]$ em CH_3CN .

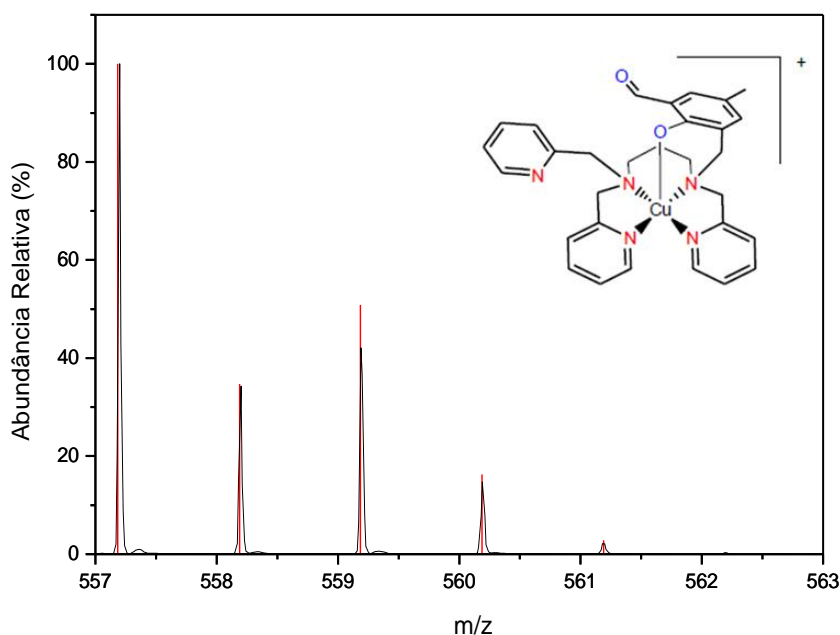


Figura 15 – Simulação de distribuição isotópica sobreposta ao espectro experimental em vermelho, com um sinal de íon molecular $m/z = [557,19]^+$.

5.2.5 Medida Eletroquímica

A eletroquímica do complexo foi investigada via voltametria cíclica devido à importância do potencial redox em processos de transferências de elétrons, principalmente em sistemas catalíticos.

Os voltamogramas cíclicos do complexo de cobre foram feitos em H_2O sob atmosfera de argônio para eliminar os possíveis processos decorrentes da presença de oxigênio em solução. Pode-se constatar um processo irreversível de redução do cobre com um potencial de pico em $-0,27$ V vs ENH. O potencial de redução foi referenciado ao eletrodo normal de hidrogênio (ENH) pelo uso do eletrodo de referência comercial Ag/AgCl (BASi). Um fator importante relacionado com a cinética de transferência de elétrons é a estereoquímica, a forma mais estável de cada estado de oxidação exerce uma influência, de maneira que quando são similares as geometrias dos estados Cu(I) e Cu(II) facilitam a transferência de elétrons.²⁸ Ao ocorrer o processo de redução, o metal passa de Cu^{2+} para Cu^+ , assumindo um sistema eletrônico d^{10} e uma nova geometria. O mais provável é a mudança da geometria para tetraédrica, que é a geometria preferencial do Cu^+ , tornando a oxidação para o complexo inicial de Cu(II) dificultada, e o processo irreversível.

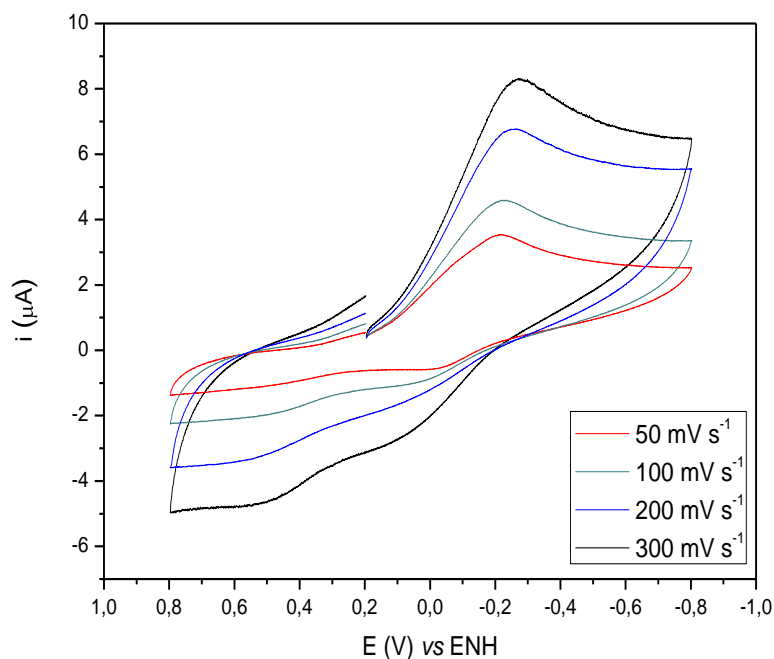


Figura 16 – Voltamograma Cíclico para o complexo em H₂O. Eletrodo de trabalho: Carbono Vítreo; Referência: Ag/AgCl; Auxiliar: Platina. Eletrólito de suporte: NaClO₄ 0,2 mol L⁻¹.

5.2.6 Titulação Espectrofotométrica

O equilíbrio de espécies foi estudado em solução através de uma titulação espectrofotométrica. Os estudos demonstraram que o comprimento de onda máximo da transferência de carga ligante-metal é deslocado com o aumento do pH. Os pontos isobésticos observados indicam que há um equilíbrio de espécies. Com o aumento do valor de pH o fenol é desprotonado e a TCLM se torna evidente devido ao aumento de espécies fenolato em solução. A presença de pontos isobésticos indica homogeneidade do meio, onde uma espécie é convertida em outra sem interferentes que absorvam em outras regiões. A partir de uma curva com perfil sigmoidal de absorbância vs pH foi possível determinar o pK_a de desprotonação do fenol como 5,17. Este valor é esperado para fenóis coordenados ao íon Cu²⁺ na posição axial.³ Para sistemas não influenciados pelo efeito Jahn Teller este valor de pK_a é menor inclusive para moléculas de água coordenadas.²⁹

Durante a realização do experimento foi possível observar a mudança de coloração da solução do complexo, em pH's ácidos a solução possui coloração

verde-azulada, e com a adição de base passou a ter uma coloração amarela. O complexo possui duas regiões principais de absorção, uma em 630 nm relativa à banda de transição interna d-d, e outra em 379 nm referente à transição eletrônica de transferência de carga $\pi(\text{fenolato}) \rightarrow \text{Cu(II)}$. Em valores baixos de pH a forma predominante do complexo possui o ligante protonado como fenol, desfavorecendo a transferência de carga, e deixando a transição eletrônica d-d responsável pela coloração do complexo, que por absorver na região de comprimento de onda de cor entre laranja e vermelho possui coloração verde-azulado. Com o aumento do pH a banda de transição d-d é deslocada para maior energia devido ao aumento da força do campo ligante, e a banda de transferência de carga torna-se mais pronunciada e influencia de forma mais efetiva na coloração do complexo. Por ser mais energética, esta transição ocorre em comprimento de onda referente à cor violeta possuindo como cor complementar a amarela.

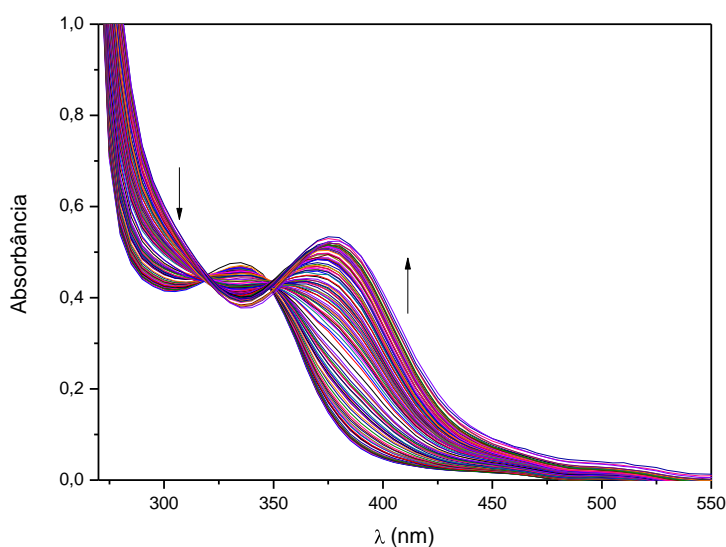


Figura 17 – Espectro de UV-vis com mudança de pH. Variação de pH: 3,5 – 9,5. Adição de NaOH 0,01 mol L⁻¹ em solução de CH₃CN /H₂O (1:1), [C]= 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ com I = 0,05 mol L⁻¹ (KCl).

5.2.7 Cinética de oxidação do 3,5-DTBC

A reação de oxidação foi acompanhada espectrofotometricamente pelo aparecimento de uma banda em 400 nm ($\epsilon = 1645 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) referente a produção da o-quinona 3,5 DTBQ em metanol. O solvente foi saturado com O₂ a cada

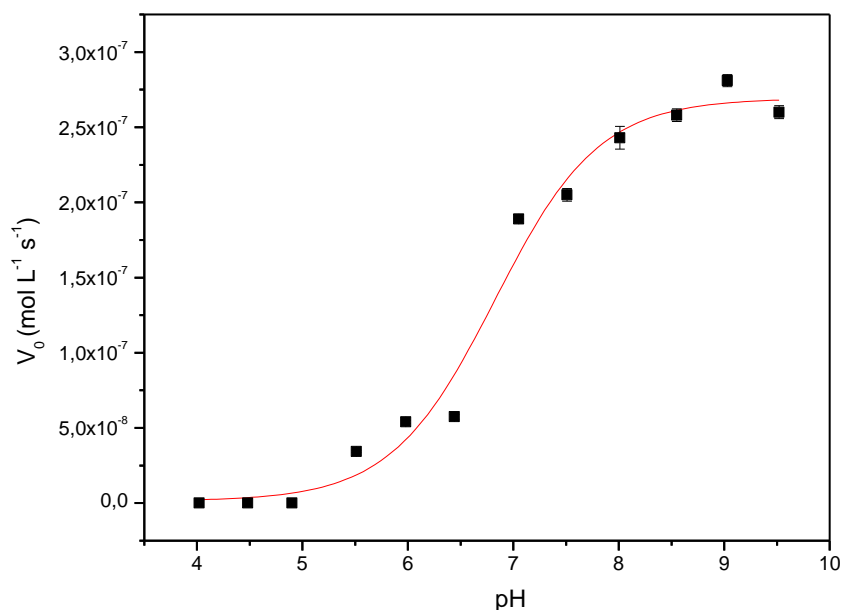


Figura 18 - Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com o pH para o complexo. Condições: [Complexo] = $2,94 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; [3,5-DTBC] = $7,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Tampões] = $2,94 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹; solução MeOH a 25 °C.

Com o objetivo de determinar os parâmetros cinéticos da reação de oxidação do 3,5-DTBC catalisada pelo complexo, foram realizados estudos da concentração do substrato 3,5-DTBC sobre a velocidade de oxidação do mesmo, estes estudos foram realizados em pH 9,0 por ser o pH de maior atividade catalítica. A Figura 19 apresenta o gráfico de constante observada (k_{obs}) em função da concentração do 3,5-DTBC. Pelo comportamento da curva de saturação, os dados cinéticos puderam ser tratados de acordo com o modelo de Michaelis-Menten para cinética enzimática, e os parâmetros estão apresentados na Tabela 5.

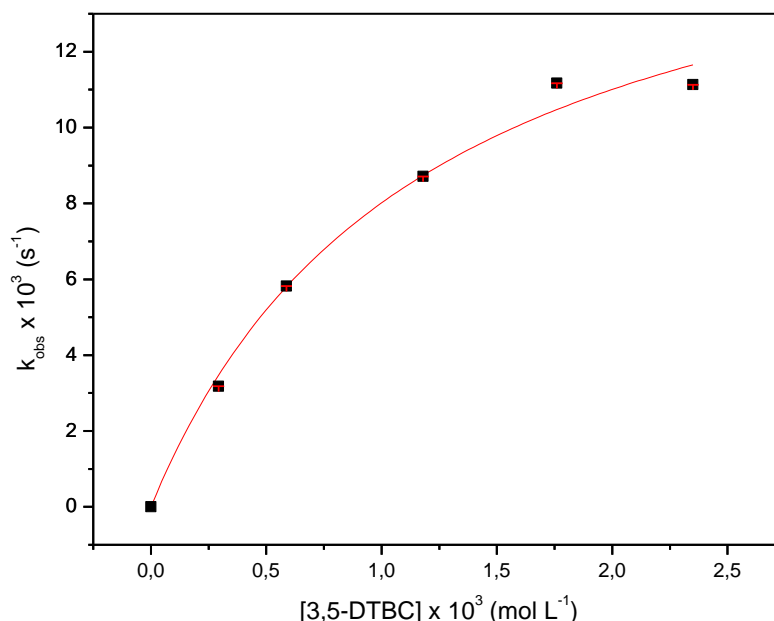


Figura 19 - Dependência da velocidade de reação de oxidação do 3,5-DTBC com a concentração de substrato. Condições: [complexo] = $1,47 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; [3,5-DTBC] = $2,94 \times 10^{-4}$ – $2,35 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [Tampão] = $5,90 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; em MeOH a 25 °C.

Para os complexos mononucleares, as investigações relatam que as reações com catecol resultam na formação da espécie intermediária semiquinona. Porém não foi possível observar durante as análises o aparecimento da banda de absorção da mesma, sugerindo que a transferência de elétrons ocorre de maneira simultânea por dois centros de cobre. Uma possibilidade é um dos átomos de oxigênio do substrato ser envolvido em uma ligação fraca com o íon cobre de unidades mononucleares adjacentes, o que conduz a estruturas dímeros ou tetrâmeros do complexo.⁷

Testes iniciais mostraram que este complexo pode ser mais eficiente frente à oxidação de catecóis quando comparado a complexos semelhantes,^{3,31} e que possui eficiência catalítica maior que um modelo binuclear³² de cobre(II) com ligantes N,O-doadores. A atividade de oxidação do complexo apresenta também um valor de eficiência catalítica similar a um complexo modelo trinuclear de cobre (II)³³.

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros cinéticos.

Compostos	$V_{m\acute{a}x}$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mol L ⁻¹)	K_{ass} (L mol ⁻¹)	$E=k_{cat}/K_m$ (L ⁻¹ mol s ⁻¹)
Catecol Oxidase ¹¹	-	2293,0	2,5 x 10 ⁻³	400	9,17 x 10 ⁵
Complexo 3 ³	(3,75 ± 0,07) x 10 ⁻⁷	0,013 ± 0,03	(1,37 ± 0,1) x 10 ⁻³	733,8 ± 53,6	9,32 ± 0,5
[Cu ₂ (HL ₁)(μ-OAc)] ³²	5,58 x 10 ⁻⁷	0,023	2,66 x 10 ⁻³	375,23	8,75
[Cu ^{II} (H ₂ LDA) ³¹	~7,0 x10 ⁻⁷	1,63 X10 ⁻²	3,5 x10 ⁻³	285,71	4,90
[Cu ₃ (L ₋₂ pyald) (μ-OAc)] ³³	~1,1 x10 ⁻⁷	0,0223	1,51 x10 ⁻³	662,25	14,86
[Cu(H ₁ L ₁)]	(2,60 ± 0,023) x10 ⁻⁷	0,018 ± 1,6 x10 ⁻⁴	(1,20 ± 0,24) x10 ⁻³	833,33 ± 166,66	15,0 ± 3,00

6. CONCLUSÕES

Os compostos 2pyprop, 3py-F, 3py-A foram sintetizados com rendimentos satisfatórios e caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV e RMN ^1H . Estas técnicas demonstraram bandas e picos condizentes com a estrutura dos compostos. O ligante final H_1L_1 foi sintetizado e caracterizado por IV, RMN de ^1H e ^{13}C , e ESI-MS. A pureza adequada para a síntese do complexo foi atingida haja vista o resultado destas análises. Um complexo mononuclear de cobre foi sintetizado, caracterizado, e teve sua atividade catalítica testada frente à oxidação do substrato modelo 3,5-DTBC. A partir das caracterizações do complexo foi possível propor um ambiente de coordenação mesmo sem obter a estrutura de raios X.

Pela técnica de IV foi possível observar que a coordenação do íon cobre ao fenol na posição apical não influencia de maneira significativa na força de ligação O-H, isto ocorre devido ao efeito Jahn Teller do sistema d^9 . O espectro UV-vis em solução permitiu supor que o complexo possui geometria octaédrica devido a apresentar uma transição alargada na região de 600-700 nm, e que quando sólido apresenta um ambiente de coordenação pirâmide de base quadrada, haja vista o ombro em menor energia no espectro de reflectância difusa. O complexo mostrou um alargamento da banda do ligante entre 300 e 400 nm devido a transferência de carga $\pi(\text{fenolato}) \rightarrow \text{Cu(II)}$, a coordenação do fenol no Cu(II) foi também evidenciada pela titulação espectrofotométrica. A condutividade auxiliou na comprovação de que há um equilíbrio de espécies no meio da forma protonada e não protonada do fenol, este equilíbrio também foi observado pelos pontos isobésticos da titulação espectrofotométrica. O potencial redox foi avaliado através de voltametria cíclica, e o sistema mostrou-se irreversível supostamente devido a mudança do ambiente de coordenação dos íons Cu(II) e Cu(I) .

Os testes cinéticos foram realizados e o complexo mostrou-se ativo para oxidação do substrato 3,5-DTBC. A evidência de que não há formação da semiquinona no ciclo catalítico indica que o complexo atua de maneira cooperativa na oxidação, transferindo simultaneamente dois elétrons ao substrato. A atividade catalítica foi comparada a outros complexos e também a própria enzima catecol oxidase. Os valores mostram que o complexo $[\text{Cu}(\text{H}_1\text{L}_1)](\text{ClO}_4)_2$ pode ser considerado modelo funcional da enzima catecol oxidase na oxidação do substrato 3,5-DTBC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ LIPPARD, S. J., BERG, J. M. Principles of bioinorganic chemistry. Mill Valley: University Science Books, **1994**. p.1-20.
- ² NEVES, A. Química Bioinorgânica. Florianópolis: Laboratório de Ensino a Distância- UFSC, **2001**.
- ³ CHAVES, V. C. C. Síntese, caracterização e atividade de catecolase de complexos de cobre com ligantes tripodais. Dissertação de Mestrado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2015**.
- ⁴ BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. Biochemistry, 5ª Ed. New York: W. H. Freeman, **2002**. p.974.
- ⁵ LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Principles of biochemistry, 3ª Ed. New York: Worth Publishers, **2000**. p.1152.
- ⁶ HOLM, R. H., KENNEPOHL, P., SOLOMON, E. I. Structural and functional aspects of metal sites in biology. Chemical Reviews, **1996**.
- ⁷ COMBA, P., MARTIN, B., MURUGANANTHAM, A., STRAUB, J. Structure, Bonding, and Catecholase Mechanism of Copper Bispidine Complexes. Inorganic Chemistry, **2012**. v. 51, p. 9214-9225.
- ⁸ KOVAL, I. A., GAMEZ, P., BELLE, C., SELMECZI, K., REEDIJK, J. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. Chemical Society Reviews, **2006**. v. 35, p.814-840.
- ⁹ BELLE, C., SELMECZI, K., TORELLI, S., PIERRE, L. J. Chemical tools for mechanistic studies related to catechol oxidase activity. Comptes Rendus Chimie, **2006**. p.272.
- ¹⁰ GERDEMANN, C., EICKEN, C., KREBS, B. The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. Accounts of Chemical Research, **2002**. v. 35, p.183-191.

- ¹¹ EICKEN, C., ZIPPEL, f., BULDT-KARENTZOPOULOS, K., KREBS, B. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. FEBS Letters, **1998**. p.293-299.
- ¹² WILCOX, D. E. Binuclear metallohydrolases. Chemical Reviews, **1996**. v. 96, p.2435-2458.
- ¹³ SILVA, P. M. Síntese, caracterização e estudos cinéticos de complexos de cobre com ligantes triazínico como modelos biomiméticos da metaloenzima catecol oxidase. Dissertação de Mestrado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2014**.
- ¹⁴ SELMECZI, K., RÉGLIER, M., GIORGI, M., SPEIER, G. Catechol oxidase activity of dicopper complexes with N-donor ligands. Coordination Chemistry Reviews, **2003**.
- ¹⁵ LOMOZIK L., GASOWSKA, A., JARZEBOWSKA, R. B., JASTRZAB, R. Coordination chemistry of polyamines and their interactions in ternary systems including metal ions, nucleosides and nucleotides. Coordination Chemistry Reviews, **2005**. v.249, p.2335–2350.
- ¹⁶ HANCOCK, R. D., WADE, P. W., NGWENYA, P., SOUSA, A. S. S., DAMU, K. V. Ligand design for complexation in aqueous solution. 2. Chelate ring size as a basis for control of size-based selectivity for metal ions. Inorganic Chemistry, **1990**. v. 29, p.1968-1974.
- ¹⁷ PANDA, K. M., SHAIKH, M. M., BUTCHER, J. R., GOSH, P. Functional mimics of catechol oxidase by mononuclear copper complexes of sterically demanding [NNO] ligands. Inorganica Chimica Acta, **2011**. p 145-151.
- ¹⁸ MEYER, F., ACKERMANN, J., KAIFER, E., PRITZKOW, H. Tuning the ativity of catechol oxidase model complexes by geometric changes of the dicopper core. Chem. Eur. J., **2002**. v. 8, nº 1, p. 247-258.

- ¹⁹ THAN, R., FELDMANN A., KREBS, B. Structural and functional studies on model compounds of purple acid phosphatases and catechol oxidases. Coordination Chemistry Reviews, **1999**. v. 182, p. 211-241.
- ²⁰ LANZMASTER, M. Desenvolvimento de novos modelos estruturais e funcionais para as fosfatases ácidas púrpuras. Tese de Doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2003**.
- ²¹ TERRA, G. G. Novos complexos mononucleares de Ga(III) e In(III) com ligantes não-simétricos: potenciais agentes quimioterápicos e radiofármacos. Tese de Doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2012**.
- ²² SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, X. F., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora LCT, **1998**.
- ²³ HUHHEY, J. E. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity 4ª Ed. New York: Harper Collins, **1993**.
- ²⁴ SCARPELLINI, M. Síntese, caracterização e reatividade de novos complexos de ferro e de cobre com ligantes imidazólicos de relevância bioinorgânica. Tese de Doutorado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2001**.
- ²⁵ MIESSLER, G. L., TARR, D. A. Química Inorgânica 5ª Ed. São Paulo: Pearson, **2014**.
- ²⁶ SHRIVER, F. D., ATKINS, W. P., LANGFORD, H. C. Inorganic Chemistry. Oxford University Press, **1990**.
- ²⁷ GEARY, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterization of coordination compounds. Coordination Chemical Reviews, **1971**. v.7, p. 81-122.

- ²⁸ OCHIAI, E. Química bioinorgánica: una introducción. Buenos Aires: Editorial Reverté, **1985**.
- ²⁹ LANZMASTER, M., NEVES, A., BORTOLUZZI, J. A., SZPOGANICZ, B., SCHWINGEL, E. New Fe^{III}Zn^{II} complex containing a single terminal Fe-O_{phenolate} bond as a structural and functional model for the active site of red kidney bean purple acid phosphatase. Inorganic Chemistry, **2002**.
- ³⁰ BANU, K. S. *et al.* Catechol oxidase activity of a series of new dinuclear copper(II) complexes with 3,5-DTBC and TCC as substrates: syntheses, X-ray crystal structures, spectroscopic characterization of the adducts and kinetics studies. Inorganic Chemistry, **2008**. V. 47, p. 7083-7093.
- ³¹ CAMARGO, P. T., PERALTA, A. R., MOREIRA, R., CASTELLANO, E. E., BORTOLUZZI, J. A., NEVES, A. New mononuclear copper(II) complex based on a salen derivative ligand with an unusual coordination and its catecholase activity. Inorganic Chemistry Communications, **2013**.
- ³² OSÓRIO, B. M. E. R., Novos ligantes e complexos binucleares de cobre(II) promíscuos: modelos miméticos para as enzimas catecol oxidases e hidrolases/nucleases sintéticas. Dissertação de Mestrado em Química – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, **2007**.
- ³³ OSÓRIO, B. M. E. R., NEVES, A., CAMARGO, P. T., MIRESKI, S., BORTOLUZZI, J. A., CASTELLANO, E. E., HAASE, W., TOMKOWICZ, Z. Synthesis, structure, magnetism, and hydrolase and catecholase activity of a new trinuclear copper(II) complex. Inorganica Chimica Acta, **2015**.